

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**OPTIMALIZACE PODMÍNEK DERIVATIZACE
MASTNÝCH A PERFLUOROVANÝCH
ORGANICKÝCH KYSELIN
METHYLCHLORMRAVENČANEM**

**Optimization of conditions for derivatization of fatty acids and
perfluorinated organic acids with methylchloroformate**

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Tomáš Hložek

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly, Dr. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

.....

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za jeho pomoc při shromažďování odborné literatury, za trpělivost a rady poskytnuté během měření a vypracovávání této práce. Velké díky také patří celé mé rodině a Terezce, kteří mě po celou dobu studia podporovali

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857 a RP 14/63 MŠMT.

.

Abstrakt

Statistickými metodami určenými pro optimalizace byly hledány a nalezeny optimální experimentální podmínky derivatizace jak perfluorovaných organických kyselin, PFA (C_8 , C_{10} , C_{12}), a mastných kyselin, FA (C_8 , C_{12} , C_{14}), tak i experimentální podmínky jejich derivatizace ve směsi. Pro všechny studované kyseliny byly proměřeny kalibrace a účinnost extrakce z acetonitrilu do heptanu.

Z původní sady experimentálních parametrů byl metodou Plackett-Burmana proveden jejich screening a významné parametry byly podrobeny optimalizaci metodou CCD, zahrnující efekty druhého řádu a interakce mezi jednotlivými parametry.

Byla nalezena optima podmínek derivatizace jednak samostatných FA a PFA, tak i pro jejich směsi. Principem hledání experimentálních podmínek derivatizace, kdy by bylo možno selektivně derivatizovat jednu ze skupiny kyselin, bylo hledání optima pro součet nebo rozdíl jejich odezev.

Bylo zjištěno, že FA ovlivňují celkovou odezvu více než PFA a že v případě požadavku selektivní derivatizace PFA v přítomnosti FA je nejdůležitějším parametrem objem přidaného methylchlormravenčanu. Absolutní selektivity derivatizace pro tyto dvě skupiny analytů nebylo dosaženo, ovšem vhodnou volbou experimentálních podmínek lze do určitého stupně ovlivnit účinnost derivatizace jedné skupiny kyselin na úkor druhé.

Klíčová slova

mastné kyseliny, perfluorované organické kyseliny, methylchlormravenčan, methylestery, derivatizace

Předmětová slova

plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, optimalizace, central composite design, Plackett-Burman design

Abstract

Statistical methods designed for optimization were applied for selection of optimal experimental conditions of derivatization process for perfluorinated acids (C_8 , C_{10} , C_{12}), fatty acids, FA (C_8 , C_{12} , C_{14}) and their mixtures. The calibration curves and the extraction efficiencies for system acetonitrile/heptane were measured for all studied acids.

The Plackett-Burman screening was performed for obtaining the significant experimental parameters from their original series and significant ones were remitted to optimization via central composite design, which takes a second order effects and mutual interactions in between parameters into account.

Optimal conditions of derivatization were found for PFA, FA and their mixtures. The principle of the search of optimal selective derivatization conditions for one group of acids in the presence of the other is based on the search of optimum on the response surface where the dependent variable is either sum or difference of acid group responses normalized to common internal standard.

It was found that FA influence total response more than PFA and that in the case of demand for selective derivatization of PFA in the presence of FA in the sample, the most significant parameter is the volume of methylchloroformate added. The complete selectivity of derivatization for these two categories of analytes was not achieved, indeed, via setting the appropriate experimental conditions the efficiency of derivatization of one of the analytes could be increased at the expense of the other one and vice versa.

Key Words Plus

fatty acids, perfluorinated organics acids, methylchloroformate, methylester, derivatization

Key Words

gas chromatography with mass spectrometry, optimalization, central composite design, Plackett-Burman design

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Teoretická část.....	10
2.1	Perfluorované sloučeniny	10
2.1.1	Akumulace a toxicita	12
2.1.2	Derivatizace a stanovení perfluorovaných látek	15
2.2	Optimalizace	22
2.3	Screening design	23
2.4	Central composite design	23
3.	Experimentální část	26
3.1	Chemikálie	26
3.2	Přístrojové vybavení.....	26
3.3	Příprava zásobních roztoků	27
3.4	Derivatizace.....	27
3.5	GC-MS analýza	28
3.6	Kalibrace	28
3.7	Extrakce.....	28
3.8	Optimalizace	29
4.	Výsledky a diskuze.....	31
4.1	Analýza GC-MS	31
4.2	Kalibrace	32
4.3	Extrakční účinnost.....	33
4.4	Optimalizace	38
4.4.1	Screening parametrů	38
4.4.2	Central composite design.....	40

4.4.3	Optimalizace PFA.....	42
4.4.4	Optimalizace PFA-FA	46
4.4.5	Optimalizace PFA+FA	49
4.4.6	Optimalizace FA	53
5.	Shrnutí a závěr.....	56
6.	Zkratky	58
7.	Citace.....	60

1. Úvod

Mastné kyseliny jsou skupinou látek, které jsou často analyzovány metodou plynové chromatografie pro potravinářské, farmaceutické, lékařské a jiné účely. Existují jejich perfluorované analogy čistě antropogenního původu, které se v přírodě vyskytují jako perzistentní polutanty, a které vzhledem k jejich specifickým vlastnostem mohou doprovázet ve vzorcích mastné kyseliny. Jak pro mastné kyseliny tak i pro perfluorované organické kyseliny je publikována řada metod stanovení pro plynovou i kapalinovou chromatografii, zatímco metody jejich společného stanovení nebyly dosud publikovány. V praxi může nastat jak situace, kdy je potřeba stanovit perfluorované kyseliny v doprovodu velkého nadbytku mastných kyselin, tak i situace, kdy je potřeba stanovit obě skupiny současně. Tyto kyseliny nelze stanovit plynovou chromatografií přímo, ale je třeba je převést na jejich těkavější formu derivatizací. Byla publikována celá řada derivatizačních postupů poskytujících například estery, amidy, fluoranilidy a jiné.

Současným trendem v analytické chemii jsou optimalizace za pomoci statistických a matematických metod. Jedním z často používaných přístupů je skupina metod tzv. odezvové plochy (response surface methodology). Dříve používané metody pro optimalizaci, kdy je optimalizován vždy jen jeden parametr a ostatní udržovány na konstantních hodnotách, tzv. „one variable at time” (OVAT), jsou nahrazovány metodami, kdy je optimalizováno několik parametrů současně. U těchto metod dochází k významné úspoře chemikálií a času experimentátora, a navíc je možno odhalit vzájemnou provázanost a závislost použitých experimentálních parametrů. S rozvojem těchto statistických metod bude akceptovatelnost prací užívajících metody OVAT klesat.

Cílem práce je pomocí statistických metod využívajících variací více parametrů v jednom experimentu optimalizace podmínek derivatizace mastných a perfluorovaných organických kyselin pro jejich stanovení metodou plynové chromatografie. Výsledkem procesu optimalizace by měly být experimentální podmínky, které dovolují efektivně

derivatizovat (a) samostatné perfluorované organické kyseliny, selektivně derivatizovat (b) samostatné perfluorované organické kyseliny v přítomnosti mastných kyselin, (c) sumu perfluorovaných a mastných kyselin.

2. Teoretická část

2.1 Perfluorované sloučeniny

Perfluorované sloučeniny (PFC) se řadí mezi perzistentní organické látky, u kterých jsou všechny vodíky v alkylovém řetězci nahrazeny atomy fluoru. Mezi často analyzované PFC patří například perfluorhexanová kyselina (PFHxA), perfluorheptanová kyselina (PFHpA), perfluoroktanová kyselina (PFOA), dále pak perfluoroktansulfonát (PFOS) a perfluoroktansulfonamid (PFOSA) a další viz. tabulka 1.

Tabulka 1 - Přehled PFC a jejich vlastností

Název sloučeniny	Zkratka	Molekulový vzorec	Molekulová hmotnost	Bod varu (°C)	Bod tání (°C)	Hustota (g/cm ³)
Perfluorhexanová kyselina	PFHxA	C ₅ F ₁₁ COOH	314,068	157	-	1,762
Perfluorheptanová kyselina	PFHpA	C ₆ F ₁₃ COOH	364,078	175	-	1,792
Perfluoroktanová kyselina	PFOA	C ₇ F ₁₅ COOH	414,088	192	53-60	1,700
Perfluornonanová kyselina	PFNA	C ₈ F ₁₇ COOH	464,098	218	69-74	-
Perfluordekanová kyselina	PFDA	C ₉ F ₁₉ COOH	514,108	218	77-83	-
Perfluortetradekanová kyselina	PFTDA	C ₁₃ F ₂₇ COOH	714,148	270	131-137	-
Perfluorbutansulfonát	PFBuS	C ₄ F ₉ SO ₃ ⁻	299,100	-	-	-
Perfluoroktansulfonát	PFOS	C ₈ F ₁₇ SO ₃ ⁻	499,140	-	-	-
Perfluoroktansulfonamid	PFOSA	C ₈ F ₁₇ SO ₂ NH ₂	499,166	-	-	-

Do skupiny perfluorovaných sloučenin se řadí také telomerní polyfluorované látky, což jsou lineární, polyfluorované sloučeniny, kde perfluorovaná část alkylového řetězce s 6 a více uhlíky je zakončena ethylenovou částí s navázanou funkční skupinou, např.

fluorotelomerní alkoholy s obecným vzorcem ($C_xF_{2x+1}CH_2CH_2OH$), zatímco typická struktura PFC má lineární řetězec se 4 až 13 atomy uhlíku:

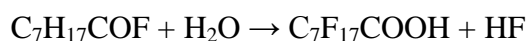
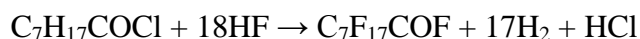
F - $(CF_2)_n$ - X, kde $n = 4 - 13$ a X = $-CH_2-CH_2-OH$, $-COOH$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$ [1]

U fluorovaných organických sloučenin jsou pozorovány jedinečné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, které jsou způsobeny velkou elektronegativitou fluoru. Konkrétně perfluorované karboxylové a alkansulfonové kyseliny jsou z PFC považovány za teplotně nejstabilnější. Vysoce polarizovaná vazba mezi uhlíkem a fluorem je jednou z nejsilnějších kovalentních vazeb (střední energie vazby C-F při 25 °C je 441 kJ/mol). Vzhledem k vysoké energii vazby jsou téměř všechny z organických fluorovaných sloučenin odolné vůči hydrolyze, fotolýze, biodegradaci a procesům v metabolismu. [2, 3]

Perfluorované látky mají speciální fyzikální a chemické vlastnosti, kterých se hojně využívá v různých průmyslových výrobcích. Jsou chemicky inertní, snižují povrchové napětí, odpuzují vodu i olej. PFOA se používá jako pomocné činidlo při výrobě polytetrafluorethylenu (PTFE) známého spíše pod názvem Teflon [1, 4, 5]. PTFE je dále součástí různých laboratorních pomůcek, (jako jsou např. SPE kolonky) a dalších fluoropolymerů. Perfluoroktanová kyselina může být přítomna ve stopových množstvích v těchto produktech a lze ji detekovat v běžných rozpouštědlech užívaných v HPLC [6]. PFC se používají jako změkčovadla v mazacích a hydraulických olejích, v nátěrových hmotách a leštidlech. Speciální hasící pěny obsahují některé perfluorované látky (konkrétně soli perfluoralkansulfonových kyselin), které podporují tvorbu vodní pěny (aqueous film forming foam, AFFF) AFFF jsou vhodné k hašení hořlavých kapalin (např. benzínu). Ve fotografickém průmyslu se využívají tyto látky k pokovování a dále se uplatňují při výrobě polovodičů [7]. V zemědělství se využívá *N*-ethylperfluoroktansulfonamid, který patří mezi specifické insekticidy používané proti mravencům a termitům. Jeho metabolitem je bioakumulativní perfluoroktansulfonamid (PFOSA) [8]. Deriváty PFOS a perfluorovaných kyselin (PFA) jsou používány na ochranu koberců, textilií, oděvů, nábytku, čalounění a výrobků z kůže proti znečištění [5].

Perfluorované látky se průmyslově vyrábí dvěma způsoby. Prvním z nich je elektrochemická fluorace, při níž je výchozí organická sloučenina ponořena do bezvodé kyseliny fluorovodíkové. Na směs je poté působeno stejnosměrným elektrickým

proudem díky čemuž dojde k nahrazení všech atomů vodíku fluorem. Je to celkem levná metoda, kterou lze získat směs převážně lineárních izomerů, rozvětvených izomerů (15 až 30 %), ale také nečistot s kratším řetězcem. Tato elektrochemická metoda byla používána k výrobě perfluoroktansulfonylfluoridu (PFOSF). Společnost 3M začala s produkcí této látky již roku 1949 [9, 10]. PFOSF dále reaguje s methylaminem za vzniku N-methylperfluoroktansulfonamid (N-MeFOSA), který reakcí s ethylenkarbonátem tvoří perfluoralkylsulfonamidoalkoholy, konkrétně N-ethylperfluoroktansulfonamidethanol (N-EtFOSE) [11]. Pro výrobu perfluoroktanové kyseliny metodou ECF slouží jako výchozí látka oktanoylchlorid. Reakce je dvoustupňová, výsledný produkt je získán hydrolyzou perfluoroktanoylchloridu z první reakce. Průběh reakce zobrazují následující rovnice:



Druhým důležitým výrobním procesem PFC je telomerizace, která vychází z reakce pentafluorjodethanu s tetrafluorethylenovými oligomery za vzniku směsi perfluoralkylderivátů. Tyto fluortelomerní deriváty byly používány k výrobě různých telomerních produktů, převážně fluorotelomerních alkoholů (FTOH). To jsou lineární, polyfluorované alkoholy s dlouhým řetězcem (obecně $\text{C}_x\text{F}_{2x+1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), které slouží jako meziprodukty při výrobě inkoustů, vosků, nátěrových hmot, barviv, lepidel, leštidel, těsnění a plastů. Telomerací vyráběné látky obsahují velmi málo nežádoucích produktů, které je navíc velmi snadné od žádoucího produktu oddělit. FTOH jsou transformovány v atmosféře a metabolizovány v organismech a mikroorganismech na fluortelomerní karboxylové kyseliny (FTCA) a perfluorkarboxylové kyseliny (PFA) [12, 13, 14].

2.1.1 Akumulace a toxicita

Použitím PFC k výrobě spotřebních produktů se tímto tyto látky dostávají do odpadních vod, kde se adsorbují na splaškový kal, respektive na jeho organickou matici. Jeho dalším využíváním při hnojení zemědělských ploch dochází k ukládání těchto látek do půd a díky jejich polaritě a pohyblivosti se opět vyplavují do

podzemních vod v téměř nezměněné podobě [15, 16]. Taktéž jejich užitím v hasících penách dochází ke kontaminaci životního prostředí (zejména povrchové a podzemní vody) perfluorovanými látkami nejčastěji na armádních základnách, letištích a v tréninkových táborech hasičských sborů [9, 17, 18]. PFOS a jeho soli nejsou příliš těkavé, přesto se díky svým vlastnostem může vázat na prachové částice a být přenášen vzduchem na dlouhé vzdálenosti. Těkavější fluorované látky, např. EtFOSE, MeFOSA a PFOSA mohou v atmosféře přetrvávat buď v plynném stavu nebo kondenzovat na částice přítomné v ovzduší a být s nimi unášeny na dlouhé vzdálenosti, přičemž na zemský povrch se poté dostávají mokrou depozicí [19]. Akumulace a osud neutrálních organohalogenovaných sloučenin v životním prostředí lze předpovědět z některých fyzikálně-chemických konstant, a to především z rozdělovacího koeficientu mezi oktanolem a vodou (K_{ow}). Díky tomu, že perfluoralkylové řetězce jsou jak lipofobní, tak hydrofobní, modely vycházející z konstanty K_{ow} nejsou příliš vhodné pro vyhodnocení akumulace a osudu PFC v životním prostředí. Běžné je také to, že pokud jsou fyzikálně-chemická data známá, často nekorespondují s naměřenými výsledky získanými různými laboratořemi a různými metodami. Příkladem může být výsledek studie provedené Gossovou a kol. [20]. V této studii vědci přišli objevili, že uhlovodíky s fluorovaným řetězcem mnohem více přecházejí do organické fáze a mají velmi nízkou tendenci zůstat ve vodné fázi, než by se očekávalo podle dostupných dat [4]. Předpokládá se tedy, že primárním sorpčním mechanismem PFC nejsou hydrofobní reakce, ale že PFC jsou vázány na sediment chemisorpcí. PFC se přednostně akumulují v krevní plazmě a játrech, čímž se odlišují od jiných perzistentních neutrálních lipofilních sloučenin, které preferují akumulaci v tukových tkáních živých organismů [21].

Možné toxické účinky zahrnují vliv na transport a metabolismus mastných kyselin, na funkci membrán a bioenergetické procesy v mitochondriích. Většina PFC je metabolizována na PFOS a PFOA, které jsou již vůči další degradaci odolné [22]. Pro sladkovodní organismy, respektive řasy a vodní rostliny je PFOS téměř akutně netoxický, přičemž pro posouzení toxicity byl sledován vliv na rychlost a intenzitu růstu. Toxicita stoupá přes bezobratlé vodní živočichy k rybám, s tím že stejný trend platí i pro chronickou toxicitu [23]. U savců a člověka jsou PFOS a PFOA dobře vstřebávány orální a inhalační cestou, v těle se nehromadí v tukové tkáni, ale kovalentně

se váží na bílkoviny v játrech a plasmě. Akutní toxicitu PFOA, PFOS pro savce zobrazuje tabulka 2. V těle savců nejsou tyto látky metabolizovány a jsou z těla vylučovány v nezměněné podobě močí a stolicí. Ve srovnání s potkany a opicemi je poločas vyloučení látek posunut od stovek dnů do řádu několika let [24].

Tabulka 2 - Akutní toxicita pro vybrané živočichy (dle citace [24])

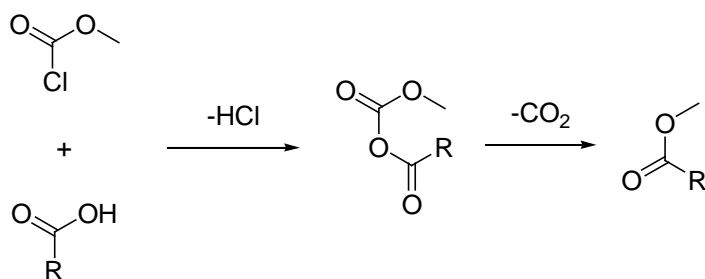
Aplikace	Exponovaný druh	Látka	Výsledek
Orální	Potkani	PFOS	LD50 = 251mg/kg
Orální	Potkani	PFOA	LD50 = 500mg/kg
Kožní	Potkani	PFOA	LD50 = 2000mg/kg
Podráždění očí	Králíci	PFOA	Dráždivý
Podráždění kůže	Králíci	PFOA	Nedráždivý
Podráždění očí	Králíci	PFOS	Mírně dráždivý
Podráždění kůže	Králíci	PFOS	Nedráždivý

Ve studii OECD bylo konstatováno, že dlouhodobé PFOS potkanům a primátům má hepatotoxický až smrtící účinek. Při dlouhodobém podávání PFOS v dávce 2 mg/kg tělesné hmotnosti/den byla u potkanů evidována zvýšená hladina jaterních enzymů, hypertrofie jaterních buněk, úbytek tělesné váhy a u vyšších dávek byl dále prokázáno, že zvyšují hladinu leptinu v krvi. U samic potkanů byla LOAEL dávka stanovena na 5 mg/l a NOAEL na 2 mg/l. PFOS dále způsobuje poruchy reprodukčního cyklu u samic potkanů. Z obou výše uvedených pozorování plyne, že látka interferuje s funkcí endokrinního systému. Při testech účinku PFOS na primáty v dávkách do 10 mg/kg tělesné hmotnosti/den bylo pozorováno zvracení, průjemy, atrofie slinných žláz a pankreatu až do úhynu zvířat.

Při sledování vlivu expozice PFOA na potkanech při koncentracích do 76 mg/kg tělesné hmotnosti/den byla pozorována jaterní hypertrofie a zvýšená hmotnost jater a ledvin. Hypertenze jaterních buněk vede k širší β -oxidaci mastných kyselin v peroxisomech. PFOA také ovlivňuje syntézu cholesterolu v játrech, je slabě karcinogenní, primárně pro játra a pankreas a Leydigovy buňky ve varlatech samců [24, 25].

2.1.2 Derivatizace a stanovení perfluorovaných látek

Z hlediska hodnot bodů varu lze teoreticky měřit PFA přímo metodou GC, ovšem jejich vysoká kyselost (např. pK_a PFOA = 2,5) způsobuje přílišné „chvostování“ jejich píků, což velmi ztěžuje jejich kvantifikaci. Pro analýzu perfluorovaných sloučenin metodou plynové chromatografie je tedy vhodné převést tyto polární látky na těkavější a méně polární látky derivatizací. Derivatizace perfluorovaných kyselin na estery lze provádět např. reakcí s chlormravenčany. Takto je možno derivatizovat různé druhy kyselin (např. mastné kyseliny, oxokyseliny, aminokyseliny) na methylestery, ethylestery, butylestery atd. podle druhu činidla – chlormravenčanu. Jeho uhlovodíkový zbytek se váže na kyselinu za vzniku daného esteru. Do reakce dále vstupuje pyridin jako katalyzátor a příslušný alkohol, který slouží jako pomocná látka. Reakce probíhá v případě chlormravenčanu methylnatého následovně:



kde R je perfluorovaný řetězec dané kyseliny a činidlem je v tomto případě chlormravenčan methylnatý, vzniklé estery jsou tudíž methylestery [26, 27, 28, 29]. Touto formou derivatizace se ve práci zabývala Dufková a kolektiv [30]. Jejím cílem bylo vyvinout rychlou metodu derivatizace PFA vzhledem k faktu, že větší pozornosti se při jejich stanovování dostává metodě HPLC-MS-(MS). Proto byla navržena derivatizační reakce s chlormravenčany, vhodná i pro derivatizaci ve vodném prostředí, kde probíhá s větším účinkem. Tato metoda byla optimalizována pro reálné vzorky odebrané z řeky Vltavy v Praze na třech místech, přičemž pouze v jednom vzorku byla stanovena PFOA ve vzorku v koncentraci 3,4 ng/ml.

Pro derivatizaci ve vodném prostředí byly v práci Vicentiho [31] použity fluorované chlormravenčany, a to pro jejich větší schopnost odolávat hydrolýze. Menší nevýhodou pro jejich rozšíření je nutnost jejich syntézy, jelikož jsou komerčně dostupné

v omezené formě. Jejich schopnost derivatizace PFA byla vyzkoušena pro citlivé stanovení metodou GC-ECD i v práci Hložka [32].

Obdobnou metodou derivatizace použili Orat a spol. [33]. Cílem byla derivatizace PFOA a dalších v rybích tkáních s následnou analýzou metodou GC-MS jako ekvivalent k LC-MS. K homogenizátu rybí tkáně ve vodě bylo přidáno známé množství perfluorovaných sloučenin jako vnitřní standard. Cílové analyty byly poté extrahovány methyl-terc-butyl-etherem (MTBE). Extrakt byl chromatograficky přečištěn, tímto vzniknul acetonový eluát s cílovými analyty, který byl následně vysušen proudem dusíku. K odparku byl přidán opět aceton s benzylbromidem. Směs byla zahřáta na 80°C a po 15 minutách opět odpařena. K odparku byl přidán chlormethan a tato směs byla injektována do GC-MS. LOQ pro PFOA byl 0,2 µg/ml. Tento LOQ pro GC-MS nedosahuje citlivosti pro studium potenciální expozice člověka perfluorovanými látkami, ale je použitelný pro vzorky z životního prostředí.

Dále je využívanou metodou reakce PFA s methyljodidem, při které taktéž dochází ke vzniku methylesterů. Tohoto derivatizačního kroku využila Moody [34] pro stanovení perfluorovaných látek ve vzorcích podzemní vody za pomoci plynové chromatografie s hmotnostní detekcí s elektronovou ionizací (GC-EI-MS).

Reakční iontově-párová mikroextrakce na tuhé fázi (SPME) za účasti tetraalkylamoniových solí vede k převedení mastných kyselin na jejich estery [35]. Jednoduchá reakce tetrabutylamoniové soli s lineárními alkylbenzensulfonáty na vláknech za vzniku butylesterů byla použita pro jejich kvantitativní stanovení [36] a je ji možno využít současně jako prekoncentrační a derivatizační krok pro stanovení těchto látek ve vodných matricích [37].

Stanovením perfluorovaných látek v různých matricích za užití SPME následovanou derivatizací v nástřikovém prostoru plynového chromatografu s hmotnostní detekcí s negativní chemickou ionizací (GC-NCI-MS) se zabýval Alzaga a Bayona [38]. PFCA byly zkoumány v různých matricích, jako jsou povrchová a podzemní voda, biologický materiál a byly derivatizovány na příslušné metyl- a butylestery. Vysoká selektivita této analytické metody byla potvrzena u butylesteru kyseliny perfluorhexanové (BuPFHxA). PFA, které obsahují méně než 6 uhlíků, například methylester kyseliny perfluorpentanové (MePFPeA), nebyly detegovány, protože během extrakce téměř nedošlo k jejich zadržení na pevné fázi. PFHpA byla objevena pouze v jednom vzorku,

přesto ale kvantifikace nebyla možná, protože koncentrace byla velmi blízko mezi stanovitelnosti. PFOA a PFDA byly detegovány ve vzorcích odpadní vody a jejich koncentrace se pohybovala v rozmezí od 0,34 do 4,32 µg/l pro PFOA a od 0,5 do 8,2 µg/l pro PFDA. Použitá metoda byla tedy spolehlivá, citlivá a selektivní pro stanovení PFA ve vodných vzorcích.

Další studie Alzagy a kol. [39] se zaměřila na vývoj metody pro stanovení perfluorovaných kyselin v mořských sedimentech. K tomuto účelu využívá tlakovou fluidní extrakci s následným převedením perfluorovaných kyselin ($C_7 - C_{10}$) na methylestery účinkem methanolu a BF_3 s následným využitím headspace SPME. Ke stanovení byla opět použita metoda GC-NCI-MS. Povrchového vzorky sedimentu byly sbírány v letech 2002 a 2003 na různých místech přístavu v Barceloně. Koncentrace PFOA a PFDA se pohybovaly od hodnot pod mezí detekce do průměrné koncentrace 12 ng/g. Detekce s NCI-MS je proto vhodnou metodou pro stanovení PFA v mořských sedimentech s detekčními limity v jednotkách ng/g.

Scott a spol. [40] se ve své práci věnovali stanovení perfluorovaných karboxylových kyselin (PFA) ve vzorcích tkání zvířete, odpadních vodách, usazeninách a vzorcích vody z jezera. Cílem jejich studie bylo vyvinutí metody umožňující detekci PFA ve formě difluoranilidů v jednotkách až ng/l. Výsledky byly porovnány ze stanovení provedených metodou GC-MS a HPLC-MS-MS. Naměřené výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 3. Z výsledků vyplývá, že plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí lze stanovit koncentrace PFA i s kratším řetězcem, ale u kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí se koncentrace těchto látek nacházejí pod mezí stanovitelnosti, přehled v tabulce 3.

Tabulka 3 - Naměřené hodnoty PFA stanovené různými analytickými metodami [40]

	<i>GC-MS</i>	<i>GC-MS</i>	<i>LC-MS-MS</i>	<i>LC-MS-MS</i>
Vzorek	(ng/l)	RSD (%)	(ng/l)	RSD (%)
PFHxA	3,3-7,5	37,8	nedetekovatelné	nedetekovatelné
PFHpA	2,0-4,3	23,1	nedetekovatelné	nedetekovatelné
PFOA	27,4-34,0	6,1	30,5-40,2	8,8
PFNA	1,3-2,9	23,6	3,1-5,9	19,7
PFDA	1,3-2,3	21,0	1,6-3,9	30,8

Scott a kol. [41] se také zabývali stanovením perfluorovaných látek, fluorotelomerních karboxylových kyselin (FTCAs) a fluorotelomerních nenasycených karboxylových kyselin (FTUCAs) ve vzorcích sedimentů. Vzorky byly získány z několika míst v severní Americe. Metoda stanovení těchto látek se skládá z derivatizace perfluoralkylkarboxylové kyseliny na její 2,4-difluoranilid v přítomnosti 2,4-difluoranilinu a N,N-dicyklohexylkarbodiimidu ve vodné fázi s následným stanovením metodou GC-MS. Vzorky ze severu Kanady obsahovaly jen velmi malé koncentrace PFOA < 0,1-6,1 ng/l. Naopak nejvyšší koncentrace (až 85 ng/l) byly zjištěny kolem velkých kanadských měst na jihu země. Přítomnost FTCAs a FTUCAs byla potvrzena ve všech čtyřech amerických lokalitách. Byly odebrány vzorky vody v různé hloubce (0-60 m pod hladinou) ze středu jezera Ontario v Kanadě. PFA byly stanoveny metodou GC-MS v koncentracích přibližně 1 ng/l ve všech hloubkách. Trifluoroctová kyselina (TFA) byla detekována pouze v hloubce 0-10 m, zatímco PFOA se vyskytovala ve všech vzorcích.

Ve studii se Moody a kol. [42] zabývala stanovením koncentrace perfluorovaných sloučenin v okolí zátoky Etobicoke. V roce 2000 došlo na blízkém mezinárodním letišti k úniku 22 000 litrů hasící pěny s velkým obsahem perfluorovaných sloučenin. Měření bylo započato druhý den po této havárii. Toxicita perfluorovaných sloučenin byla zkoumána v jaterní tkáni ryb, kde se PFOS přednostně akumuluje. Koncentrace PFOS v jaterní tkáni ryb stanovená pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS-MS) po extrakci na pevné fázi byla v rozmezí od 2,00 do 72,4 µg/g. Ve vzorcích povrchové vody bylo možno perfluorované látky detekovat po několik měsíců. Celková koncentrace PFOS se pohybovala do 2,21 µg/ml. Koncentrace PFOA se pohybovala do 11,3 µg/ml.

Skupina belgických vědců se ve své studii věnovala vztahu mezi množstvím PFC deponovaným v játrech a peří ptáků na různých trofických úrovních. Nejvyšší koncentrace PFOS v játrech klesala v pořadí volavka (476 ng/g), racek (292 ng/g), krahujec (236 ng/g), straka (17 ng/g) a hrdlička (12 ng/g), zatímco koncentrace v peří klesala v pořadí volavka (247 ng/g), krahujec (102 ng/g), racek (79 ng/g), hrdlička (48 ng/g), straka (31 ng/g). Dle Pearsona bylo dosaženo významné hladiny korelace dat mezi hladinami PFOS v játrech a peří ($R=0,622$), vedoucí k možnému neinvazivnímu odběru biologického materiálu pro biomonitoring expozice perfluorovaným látkám,

zvláště ohrožených druhů. Dalšími výhodami jsou snadnost sběru vzorků např. v hnízdech a možnost monitorovat konkrétního opeřence v delším časovém úseku. Samotná příprava spočívá v omytí vzorku ACN pro odstranění nečistot, vysušení, rozmělnění a rozpuštění v 69% HNO₃, neutralizaci NaOH a následnou SPE extrakci vzorku s následnou HPLC- MS-MS analýzou [43].

V podobné studii [44] v povodí řeky Tsurumi v Japonsku byla pozornost zaměřena na vliv srážek na koncentraci PFC v řece. Byl sledován průběh hladin PFC na čtyřech různých místech řeky a ve vodě proudící do řeky z přilehlých čističek odpadních vod. Z výsledků studie plyne, že PFOS, PFNA a PFDA jsou v řece ve vyšších koncentracích oproti PFHxA, PFHpA v důsledku jejich většího využití v produktech domácího použití, v lécích a kuchyňském vybavení. Při měření vzorků odebraných v době zvýšených srážek docházelo k 2-5 zvýšení koncentrací jednotlivých perfluorovaných kyselin a potvrzení domněnky o šíření PFC daleko od přímých zdrojů znečištění.

V práci [45] byla vyvinuta metoda pro rychlou LC-MS bez prekoncentračních kroků způsobujících možnou kontaminaci vzorku či ztráty cílové látky, a s přímým dávkováním vzorku. Touto metodou je možno analyzovat vzorek PFC během 4 minut. Analýza je prováděna za izokratických podmínek, protože pokud nedojde k odstranění možných zdrojů fluorovaných reziduí (Teflon tubing, filtry), dochází k jejich rovnoměrnému uvolnění a tím pádem konstantnímu pozadí. Rovněž byla diskutována problematika mezilaboratorních měření vzorků různými kvantifikačními metodami, konkrétně metoda standardního přídatku (SA) a vnitřního standardu (IS). ¹³C₂-PFOA byla použita jako SA. Rozdíl mezi hodnotami získanými ze vzorků za použití obou metod byl menší pro jezero Ontario než pro komplexnější vzorky s vyšším množstvím rozpuštěných látek a organickým obsahem. Hodnoty PFOA získané metodou IS byly obvykle vyšší než hodnoty naměřené metodou IS. Ze statistického hodnocení dat vyplývá, že měření metodou SA je přesnější.

Ve studii [46] byly zkoumány hladiny PFC v různých rakouských jezerech a řece Dunaj z důvodu sledování znečištění středoevropského prostoru. Polutanty PFC a PFS nebyly naměřeny v jezerech, zatímco PFOA byla detegována ve všech vzorcích až do koncentrace 1,7 ng/l. PFOA, PFHpA byly odebrány na různých odběrných místech na Dunaji v koncentracích od 0,1 do 5,1 ng/l. Zajímavým faktem je, že ačkoli odpadní

vody tvoří maximálně 10% celkového průtoku, připadá na toto množství až 50% veškeré zátěže toku PFC. Analýzy byly provedeny po LLE extrakci s následnou LC-MS-MS detekcí.

Tabulka 4 - Koncentrace PFOA, PFOS ve světě dle [46]

Reference	Lokace	PFOA [ng /l]	PFOS [ng /l]
Huset et al. (2008)	řeka Glatt/Švýcarsko	7.0–7.6	43–60
Sinclair et al. (2006)	říční voda/USA	18–173	1.5–13
Sinclair et al. (2006)	jezerní voda/USA	10–64	0.8–1090
Senthilkumar et al. (2007)	řeka Tokyo/Japonsko	7.9/110	-
Taniyasu et al. (2003)	povrchové vody/Japonsko	-	2.5–21
Takagi et al. (2008)	říční vody/Japonsko	5.2–80	0.26–3.2
Takagi et al. (2008)	jezerní vody/Japonsko	20–92	1.0–4.6
Skutlarek et al. (2006)	řeka Rýn/Německo	2–3640	2–192
LfU (2006)	povrchové vody/Německo	1–7500	1–42

V rámci celoevropského prostoru byla provedena studie [47] znečištění více než stovky evropských řek souborem 35 vybraných perzistentních polutantů, například léků, pesticidů, PFOA, PFOS. Velká pozornost byla věnována právě perfluorovaným sloučeninám pro jejich nedegradovatelnost v životním prostředí a následné akumulaci v organismech. Analýzy vzorků byly provedeny metodou RPLC-MS s ionizací elektrosprejem za atmosférického tlaku. Nejvíce znečištěnou řekou na evropském kontinentě byla italská řeka Po, kde bylo naměřeno kolem 200 ng/l PFOA, ačkoli nutno uvést, že několik velkých řek nebylo do výzkumu zahrnuto. Dále ze studie odhalila, že průměrné znečištění řek PFOS se pohybuje kolem 6 ng/l, znečištění PFOA je nižší a sice 3 ng/l.

Práce Fromma [48] se zaměřila na sumarizaci dat o distribuci PFC z různých monitorovacích průzkumů, jak v životním prostředí, tak v povrchové pitné vodě a potravinách s cílem zjistit míru expozice člověka těmto látkám. Následovalo srovnání hodnot s doporučenými tolerovanými denními dávkami (TDI) různými národními

hygienickými autoritami. K expozici u člověka dochází jednak inhalací kontaminovaného vzduchu či prachu, tak pitím kontaminované vody a jídlem. V posledním hodnocení PFOS a PFOA Komisí pro toxicitu a chemikálie v potravinách Velké Británie (UK Committee on Toxicity of Chemicals in Food) byla doporučena TDI 300 ng/kg tělesné hmotnosti pro PFOS a 3000 ng/kg tělesné hmotnosti pro PFOA. Německý federální institut pro odhadování rizik (German Federal Institute for Risk Assessment) stanovil TDI na 100 ng/kg tělesné hmotnosti pro obě látky. Odhadnutá expozice těmto látkám byla průměrně stanovena pro PFOS na 1,6 ng/kg tělesné hmotnosti a pro PFOA na 2,9 ng/kg. Tyto hodnoty jsou řádově nižší než výše doporučené tolerované denní dávky.

Většina studií se zaměřuje na koncentrace PFOA, PFOS v životním prostředí, zatímco balící materiály, zvláště ty potravinářské, přichází do přímého kontaktu s potravinami, a proto je žádoucí přesně určit stopové hladiny PFOA a PFOS v těchto materiálech. V souvislosti s těmito polutanty je predominantní metodou analýzy LC-MS, zatímco metoda GC-MS je opomíjena, navzdory nižší ceně techniky a množství derivatizačních procedur pro PFC vzorky. Proto studie Ganga [49] přichází s rychlou a jednoduchou metodou PLE extrakce PFOA z balících materiálů a silylací vzorku a analýzou na GC-MS, přičemž parametry extrakce a silylace byly optimalizovány užitím metody odezvvé plochy (response surface methodology). Při PLE jsou nejdůležitějšími faktory teplota a tlak a jsou na sobě závislé. Bylo vybráno pět úrovní pro každý parameter a maximum bylo nalezeno za pomoci CCD. Výtěžek reakce roste s teplotou a tlakem a dosahuje maxima při 108 a 86 barech pro PFOA. S rostoucí teplotou dochází k rychlejší desorpci analytu z adsorbentu a rychlost transportu analytu do organického rozpoštědla také roste. Pro silylaci byly jako faktory zvoleny teplota reakční směsi (20°-70°C) a čas (15 až 120 minut). Jako optimum byly vypočteny hodnoty 40°C a 60 minut. Zkoumání byly podrobeny 3 balící materiály a výsledné koncentrace byly v rozmezí 5-45,9 mg g⁻¹ pro PFOA a 33,7-81,3 mg g⁻¹ pro PFOS.

2.2 Optimalizace

Termínu optimalizace se hojně užívá v analytické chemii ve významu zjištění podmínek měření, ve kterých bude použita metoda podávat nejlepší dosažitelné výsledky [50].

Tradičně je optimalizace v analytické chemii chápána jako tzv. „one –variable-at-a-time“, jinými slovy, že je měněn pouze jeden z parametrů celého systému zatímco ostatní zůstávají na konstantních hodnotách. Tento způsob optimalizace má však několik nevýhod. Jednou z nich je opominutí vlivu interakcí mezi jednotlivými parametry. Z toho plyne, že „one-variable-at-a-time“ metoda (OVAT) dostatečně kvalitně nevysvětluje celkový vliv parametru na chování systému. Další podstatnou nevýhodou OVAT optimalizace je množství prováděných experimentů nutných ke zjištění nastavení optimálních hodnot požadovaných parametrů. S růstem počtu experimentů taktéž narůstá spotřeba chemikálií, mnohdy toxických, což je ostře v kontrastu s trendy zelené chemie. V neposlední řadě dochází k signifikantní ztrátě času experimentátora.

Z těchto důvodů se začaly v analytické chemii používat různé statistické a matematické metody a postupy, k nimž se řadí tzv. „response surface methodology“ (RSM, metody odezvvé plochy).

Hlavní idea RSM je v užití minimální série plánovaných experimentů s cílem získat optimální odpověď systému.

Postup RSM:

1. výběr hlavních nezávislých proměnných v systému pomocí screeningu a vymezení experimentálního rozsahu proměnných
2. návrh experimentálního plánu (designu) a provedení experimentů podle něj
3. zjištění nejčastěji polynomiální funkce, která je využita k matematicko-statistickému popisu a vyhodnocení získaných experimentálních dat
4. otestování získaného modelu
5. ověření nutnosti a možnosti posunutí experimentálního prostoru experimentu
6. získání optimálních hodnot pro každou studovanou proměnnou

Výhodou je i možnost práce se souborem analytů, přičemž po provedení požadované série experimentů lze hledat optima jak pro jednotlivé analyty, tak i pro jejich libovolné kombinace [50, 51].

2.3 Screening design

Počet proměnných ovlivňuje odpověď studovaného systému a je téměř nemožné určit a zkontrolovat příspěvky každé z nich. Proto je nutné vybrat pouze parametry s největšími efekty. Screening design je prvním krokem v rámci RSM a je využíván ke stanovení souboru experimentálních parametrů nejvíce ovlivňujících odpověď systému. K tomuto účelu se používá plný (full factorial design) nebo částečný dvou-úrovňový faktorový design (two level fractional factorial design), případně Plackett-Burmanův design. Plný faktorový design je vhodný k použití při screeningu dvou až tří parametrů, jelikož při více parametrech se projeví jeho nevýhoda ve velkém počtu nutných experimentů N ($N = m^k$, kde m je počet úrovní, pro dvou-úrovňový design je m rovno 2 a k je počet parametrů). Částečný faktorový design pracuje s počtem experimentů N' , kde $N' = m^{k-p}$, kde m je počet úrovní, k je počet parametrů a p je velikost frakce plného faktorového designu. Příkladem může být 2^{5-2} design reprezentující čtvrtinu provedených experimentů plného faktorového designu pro pět faktorů při dvou úrovních. V praxi bývá počet úrovní roven dvěma, k testování na více hladinách se přistupuje u komplikovanějších designů.

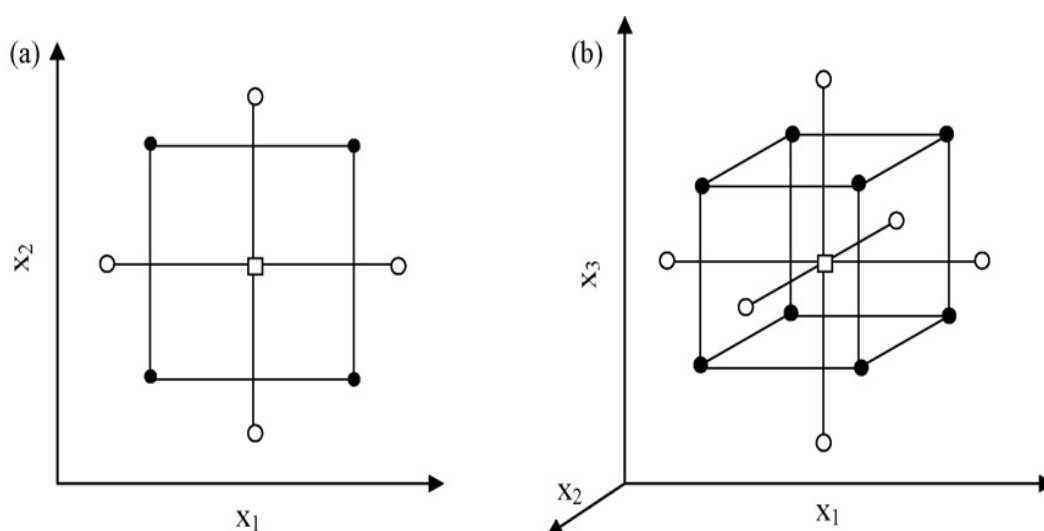
Dvouúrovňové faktorové designy jsou používány pouze k odhadu efektů prvního řádu, nejsou tedy brány v potaz interakce mezi parametry. K lepšímu zhodnocení celého systému a vytvoření matematické rovnice je nutno použít designy, které zkoumají i vzájemné interakce mezi zjištěnými parametry [50, 52].

2.4 Central composite design

Central composite design (CCD) je jednou z nejfrekventovanějších metod v RSM. Metoda je univerzální a výhodou je její velká účinnost, protože poskytuje maximum informací o experimentech a celkové experimentální chybě s co nejmenším počtem nutných pokusů [50, 53].

CCD vzniká spojením několika různých designů jak vidno z obrázku 1. Prvním z nich je plný (v některých případech částečný) faktorový design, který zahrnuje

rohové body a používá kódované hodnoty -1 a $+1$. Druhým je star design, který používá kódované hodnoty $-\alpha$, 0 a $+\alpha$, kdy hodnota 0 je střední hodnotou kódovaných -1 a 1 a bývá nazývána centrální bod. Alfa body se nazývají osové a určují kvadratické zakřivení. Poslední součástí CCD jsou opakovaná měření v centrálním bodě 0 pro zvýšení přesnosti výsledků experimentu [53, 54].



Obrázek 1 - Central composite design pro optimalizaci: (a) dvou parametrů ($\alpha = 1.41$) a (b) tří parametrů ($\alpha = 1.68$). (plný bod) body factorial designu, (prázdný bod) osové body a (hranatý bod) centrální bod [50]

Celkový počet nutných experimentů je vypočten dle rovnice $N = k^2 + 2k + c_b$, kde k je počet parametrů a c_b je počet opakování měření v centrálním bodu. Kódovaná hodnota α závisí na počtu parametrů a je vypočtena dle vztahu $\alpha = 2^{(k-p)/4}$, kde k je počet parametrů, $p=1$ a pro 3, 4, 5 faktorů je rovna 1,41 ; 1,68 ; 2,00. Parametry jsou sledovány na pěti úrovních $(-\alpha, -1, 0, 1, \alpha)$.

Metoda CCD se dělí na tři základní typy, a to na „face-centered CCD“ (fcCCD), na „rotatable CCD“ (rCCD) a na „inscribed CCD“ (iCCD). Rotatable nebo inscribed CCD by měl být použit pokud existují nedosažitelné podmínky ve dvou či více extrémech experimentálního prostoru. Naopak face-centered CCD by měl být použit pokud koresponduje s cílovým operačním regionem, případně pokud nedosažitelné podmínky existují jen v jednom extrému. V metodách rCCD a iCCD je každý parametr sledován na pěti úrovních, u fcCCD postačují pouze tři. V porovnání

s fCCD nabízí ostatní designy redukci predikční chyby pro kvadratické zakřivení odezvové plochy a zaleží pouze na experimentátorovi zda se mu větší komplexita těchto designů vyplatí [54].

Metodou CCD se získá matematický výraz popisující vztahy a interakce mezi jednotlivými faktory a zároveň zakřivení celého vybraného prostoru.

Po zjištění matematického výrazu modelu je dalším krokem zjištění hodnot optima pro jednotlivé faktory. Vybírat lze z velkého množství různých optimačních metod, které se v mnohém liší. Běžně se ke zjišťování optima využívá Derringerova „desirability“ funkce. V praxi jsou optimální hodnoty proměnných zjišťovány statistickými programy. Základní principy a postupy byly čerpány z několika prací a monografií [50, 54, 55, 56].

V praxi lze optimalizovat nesčetně parametrů jako například koncentrace činidel, pufrů a jiných reagentů, pH, teplotu, iontovou sílu, eluční sílu a podobně. Příklady aplikací CCD na chromatografické metody uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 - Aplikace CCD pro optimalizaci chromatografických metod dle [50]

Analyt	Vzorek	Předmět	Chromatografická technika
2,4,6-Trichloroanisol (TCA)	Znečištěná voda	Separace	GC-ECD
Chloropicrin	Půda	Stanovení	GC-MS
Erythromycin	Léky	Separace	HPLC
Fenoly	Víno	Separace	GC
Rezidua pesticidů	Půda	Extrakce	GC-MS
Akrylamid	Pitná voda	Separace	IEC-MS
Prostaglandin E-2	Lidská plasma	Extrakce	HPLC-MS
Těkavé složky	<i>Evodia rutaecarpa</i>	Extrakce	GC-MS
Chloroanisol	Dubové sudy	Extrakce	GC-FID
Kokain	Kokové listy	Extrakce	GC-FID
MTBE	Voda	Extrakce	GC-FID
Organochlorové pesticidy	Rostlinný extrakt	Separace	GC-MS

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

Použity byly tyto standardy: kyselina hexanová (98%, Merck, Schuchardt, Německo), kyselina oktanová (98%, Fluka, Lancaster), kyselina dekanová, kyselina dodekanová, kyselina tetradekanová (čistá, Lachema, Neratovice, Česká Republika), methylester kyseliny dekanové (99%, Poly Science, Kit 611CX), kyselina perfluorhexanová (> 97%), kyselina perfluoroktanová (95%, obě Fluka, Lancaster), kyselina perfluordekanová (98%) a kyselina perfluordodekanová (95%, obě Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), methylester kyseliny perfluoroktanové (98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Použitými chemikáliemi byl heptan (> 99%, Merck, Schuchardt, Německo), hexan (99%, Baker Analyzed, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holandsko), acetonitril (p.a., Lichrosolv, Merck, Darmstadt, Německo), methylalkohol (p.a., Lach.-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika), pyridin (99%) a chlormravenčan methylnatý (99%, oba Aldrich, Steinheim, Německo).

3.2 Přístrojové vybavení

Analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem GCMS-GP5050A, (Shimadzu Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) s kolonou SPB-30 (Supelco, Bellefonte, USA, o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 1 μ m, 35 % difenyl - dimethylpolysiloxan). Nosným plynem bylo helium (5.0, Linde). K dispozici byl hmotnostní spektrometr s EI ionizací (energie 70 eV).

Ke sběru dat sloužil program LabSolution (GCMS solution 1.2, Shimadzu).

K interpretaci hmotnostních spekter byla použita knihovna spekter NIST 05 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, National Institute of Standards and Technology, USA). Vzorky byly vytřepávány na třepačce (Vortexgenie 2, Scientific Industries, Hampshire, Velká Británie) a promíchávány v ultrazvukové lázni (Sonorex RK 100, Bandelin, Barlen, Německo). K pipetování sloužily automatické pipety 1-5 ml,

100-1000 μ l a 10-100 μ l (všechny Biohit, Helsinky, Finsko), 100 μ l (Hamilton, Reno, USA) a 5 μ l (Plastomed, Polsko).

3.3 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok methylesteru kyseliny dekanové

Zásobní roztok methylesteru kyseliny dekanové byl připraven tak, že 0,1041 g látky bylo doplněno do 10 ml acetonitrilem (zásobní roztok o koncentraci 10,41 mg/ml).

Zásobní roztok methylesteru kyseliny perfluoroktanové

Zásobní roztok methylesteru kyseliny perfluoroktanové byl připraven tak, že 0,1058g látky bylo doplněno do 10 ml acetonitrilem (zásobní roztok o koncentraci 10,58 mg/ml).

Zásobní roztoky mastných kyselin

Byly připraveny zásobní roztoky 4 mastných kyselin - kyseliny hexanové (HK), kyseliny oktanové (OK), kyseliny dekanové (DK) a kyseliny dodekanové (DoK). Bylo naváženo asi 100 mg přesně jednotlivých kyselin a kvantitativně byly převedeny do skleněných odměrek a doplněny do 10 ml acetonitrilem. Takto byly získány zásobní roztoky HK (10,12 mg/ml), OK (10,12 mg/ml), DK (10,01 mg/ml) a DoK (10,02 mg/ml).

Zásobní roztoky perfluorovaných kyselin

Byly připraveny zásobní roztoky 4 perfluorovaných kyselin - kyseliny perfluorhexanové (PFHexA), kyseliny perfluoroktanové (PFOA), kyseliny perfluordekanové (PFDA) a kyseliny perfluordodekanové (PFDoA). Bylo naváženo asi 100 mg přesně jednotlivých kyselin a kvantitativně byly převedeny do polypropylenových odměrek a doplněny do 10 ml acetonitrilem. Takto byly získány zásobní roztoky PFHexA (10,16 mg/ml), PFOA (10,07 mg/ml), PFDA (10,11 mg/ml), PFDoA (10,17 mg/ml).

3.4 Derivatizace

Reakční médium bylo připraveno o tomto složení: 20 μ l vzorku, 158 μ l acetonitrilu, 4 μ l pyridinu a 8 μ l methanolu. K reakčnímu médiu bylo přidáno 10 μ l chlormravenčanu methylnatého (MCF) jako činidla. Tato směs byla promíchána po dobu 20 s v ultrazvukové lázni a po osmi minutách bylo ke směsi přidáno 200 μ l hexanu a na třepačce byl po dobu 1 minuty vytřepáván vzniklý methylester do hexanu.

Pro měření je třeba jen horní hexanová fáze, která byla pipetou odebírána do nové čisté vialky. Tato hexanová fáze byla poté dávkována do plynového chromatografu. Tento postup byl opakován vždy pro nové měření. To znamená, že pro každé měření byla provedena nová derivatizace, pokud není uvedeno jinak.

3.5 GC-MS analýza

Methylestery po derivatizacích byly měřeny na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem. Pro všechna měření bylo zvoleno toto nastavení: teplota injektoru 250 °C, teplota MS interface 260 °C, split poměr 1:50. Na první předběžná měření byl použit scan mód, který proměřil všechny hodnoty m/z od 50 do 650 rychlostí 1000 m/z s⁻¹. Teplotní program byl nastaven od 50 °C (izotermicky 2 min) do 250 °C s teplotní rampou po 10 °C/min, průtok kolonou 1,3 ml/min. Pro další analýzy bylo měřeno v SIM módu pro hmoty m/z 43, 59, 74, 87, 131, 158, 169, 186, 214, 242. Teplotní program byl nastaven od 40 °C (izotermicky 4 min) do 235 °C s teplotní rampou po 15 °C/min, průtok kolonou 1 ml/min.

3.6 Kalibrace

Z připravených zásobních roztoků kyselin byly vhodným ředěním připraveny směsné kalibrační roztoky skládající se z PFOA, PFDA, PFDoA a OA, DoA, TetraA a MeDA o koncentracích 1, 10, 20, 50, 100, 250 µg/ml (ppm). Pro každou koncentraci byly provedeny tři opakovaná měření.

3.7 Extrakce

Po derivatizaci směsi mastných kyselin ve složení PFOA, PFDA, PFDoA, OA, DoA, TetraA a vnitřního standardu MeDA (IS) byla provedena extrakce methylesterů příslušných kyselin vytřepáním do 200 ml heptanu. Tato fáze byla poté odebrána a následně proměřena na GC-MS.

Pro zjištění účinnosti derivatizace bylo do výše uvedené derivatizační směsi opět přidáno 200 ml heptanu, tato fáze byla po vytřepání opět proměřena. Tento postup byl opakován celkem pětkrát, bylo tedy ve výsledku proměřeno 5 heptanových fází z jednoho vzorku. Stejný postup byl aplikován i na směs samotných perfluorovaných

organických kyselin ve složení MePFOA(IS), PFDA, PFDoA a směs samotných mastných kyselin ve složení OA, DoA, TetraA a MeDA (IS).

3.8 Optimalizace

Analýzy pro screening

Pro účely optimalizace podmínek derivatice byla provedena série derivatizací dle tabulky 6 a následných analýz metodou GC-MS.

Tabulka 6 - Plackett-Burmanova designová kódovaná matrice pro screening, reálné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 12

měření	čas	teplota	ultrazvuk	pyr	MCF	trepani	dummy1
1	1	1	1	1	1	1	1
2	-1	1	-1	-1	1	-1	1
3	-1	-1	1	1	-1	-1	1
4	-1	-1	-1	1	1	1	-1
5	1	1	-1	1	-1	-1	-1
6	-1	1	1	-1	-1	1	-1
7	1	-1	1	-1	1	-1	-1
8	1	-1	-1	-1	-1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1
10	-1	1	-1	-1	1	-1	1
11	-1	-1	1	1	-1	-1	1
12	-1	-1	-1	1	1	1	-1
13	1	1	-1	1	-1	-1	-1
14	-1	1	1	-1	-1	1	-1
15	1	-1	1	-1	1	-1	-1
16	1	-1	-1	-1	-1	1	1

Analýzy pro central composite design

Pro účely optimalizace podmínek derivatice byla provedena série derivatizací dle tabulky 7 a následných analýz metodou GC-MS.

Tabulka 7 - Kódovaná matice pro central composite design, reálné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 14

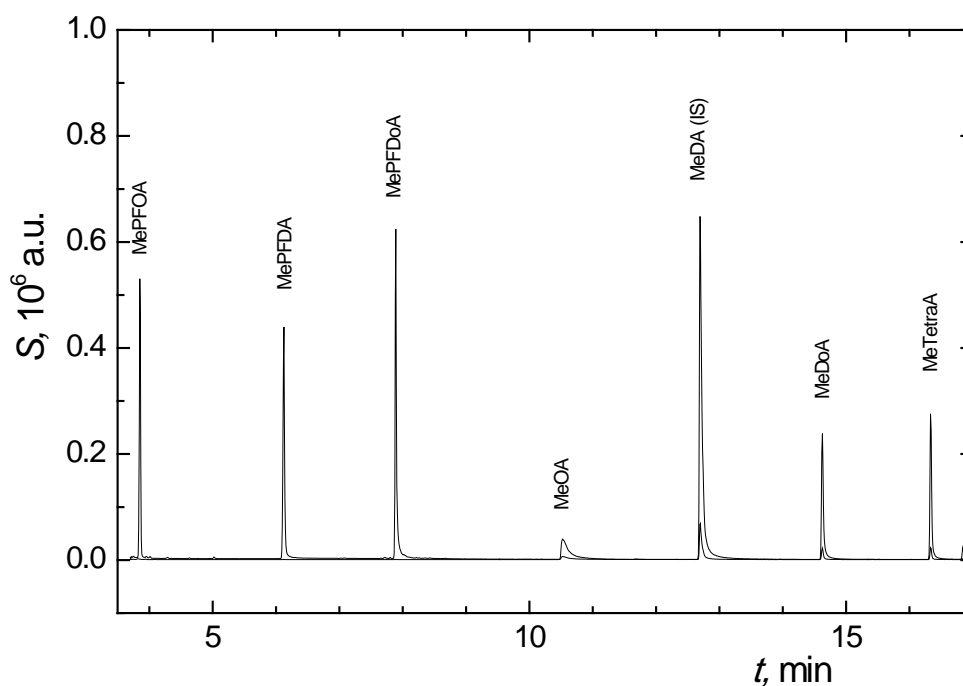
měření	pyridin	MCF	třepání
1	0	0	0
2	1	1	1
3	1	-1	-1
4	0	0	0
5	0	0	-1,73
6	0	0	1,73
7	0	1,73	0
8	0	0	0
9	-1	1	-1
10	0	0	0
11	-1	-1	-1
12	1	-1	1
13	0	0	0
14	-1,73	0	0
15	1,73	0	0
16	0	0	0
17	-1	-1	1
18	1	1	-1
19	0	-1,73	0
20	-1	1	1

V barevných obrázcích v kapitole 4. je rostoucí odezva vyznačena barevně v pořadí od modré přes zelenou a žlutou k červené.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Analýza GC-MS

Pro zamýšlenou optimalizaci směsi mastných a perfluorovaných organických kyselin byla vybrána vždy řada kyselin lišících se v řetězci o jeden uhlík, konkrétně hexanová (HxA), oktanová (OA), dodekanová (DoA), tetradekanová (TetraA) pro mastné kyseliny a analogicky PFHxA, PFOA, PFDA, PFDoA pro perfluorované. Perfluorovaný analog TetraA nebyl bohužel k dispozici. Methylester kyseliny dekanové byl používán jako vnitřní standard. Při měření derivatizované směsi samotných PFA bylo zjištěno, že methylester kyseliny perfluorhexanové (MePFHxA) vzhledem ke své vysoké těkavosti koeluuje s rozpouštědlem na začátku chromatogramu a ani změnou experimentálních podmínek, tedy teplotního programu, změnou tlaku a lineárního průtoku kolonou se nepodařilo dosáhnout rozumného rozlišení

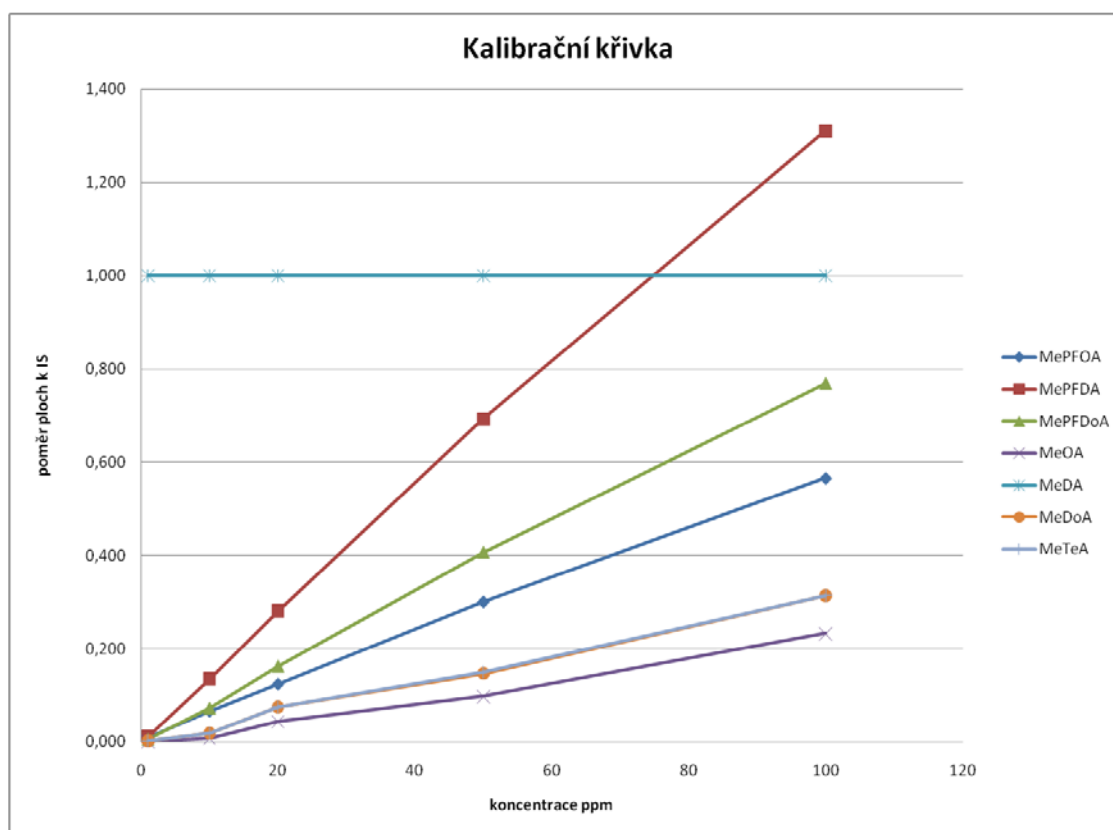


Obrázek 2 – Chromatogram směsi mastných a perfluorovaných organických kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ (PFOA, PFDA, PFDoA, OA, DoA, TetraA, DA jako IS)

. Ze souboru analytů pro další analýzy byla tedy PFHxA vyřazena. Z podobného důvodu byla nakonec vyřazena i HxA, která taktéž koeluovala s nečistotou z derivatizační směsi a další změny v nastavení experimentálních podmínek by zbytečně zasáhly do celé analýzy směsi. Chromatogram použité směsi kyselin je na obrázku 2.

4.2 Kalibrace

Kalibrace byla provedena z důvodu zjištění, zda je měřicí proces pro požadovaný rozsah koncentrací lineární. Na obrázku 3 je zobrazena lineární oblast koncentrací, s tím že nad 100 $\mu\text{g/ml}$ začíná být závislost nelineární. Pro další derivatizace a měření proto bylo pracováno se vzorky o koncentraci kyselin 1000 $\mu\text{g/ml}$ před desetinásobným zředěním v reakční směsi.



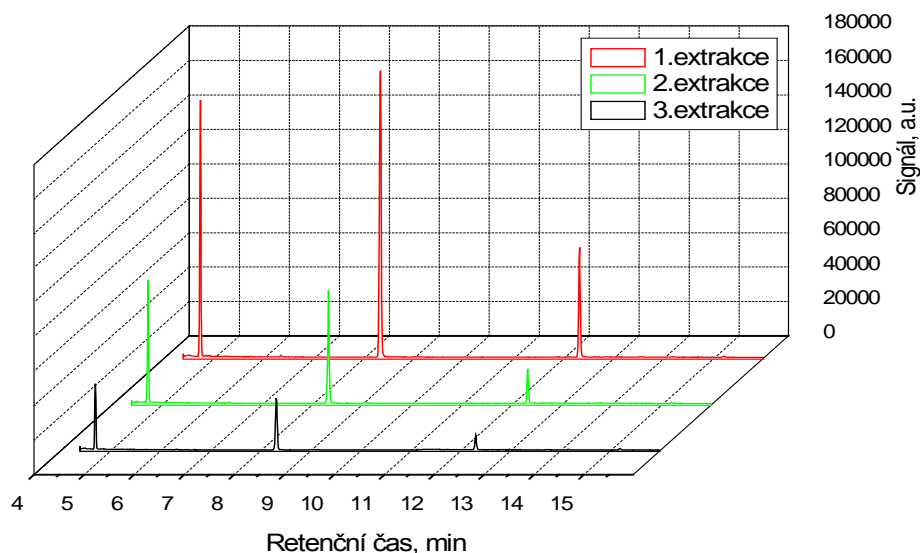
Obrázek 3 – Kalibrační křivky směsi PFA a FA v koncentracích od 1 do 100 µg/ml (1-100 ppm)

Tabulka 8 – Směrnice kalibračních závislostí jednotlivých kyselin

	PFOA	PFDA	PFDoA	OA	DoA	TetraA
směrnice						
(ml/µ)	0,005604	0,013123	0,007734	0,002364	0,003149	0,003146

4.3 Extrakční účinnost

Po vytřepání derivatizační směsi do heptanu byla tato fáze odebrána a přeměřena metodou GC-MS. Z důvodu zjištění extrakční účinnosti a určení absolutní koncentrace vzniklého methylesteru byla provedena zkouška účinnosti extrakce postupným vytřepáváním derivatizační směsi a následným odebíráním alikvotního množství heptanu. Každý alikvot byl následně přeměřen na GC-MS. Výsledné plochy píků příslušných kyselin byly sečteny a vypočítáno procentuální zastoupení jednotlivých kyselin v jednotlivých extraktech dle tabulky 9 a 10.



Obrázek 4 – Graf zobrazující pokles koncentrace PFA ve třech po sobě jdoucích extrakcích jednoho vzorku

Na obrázku 4 je graf zobrazující klesající koncentrace perfluorovaných kyselin po třech po sobě jdoucích extrakcích z jedné derivatizační směsi v acetonitrilu. Přídáním heptanu do reakční směsi dojde zároveň k zastavení derivatizační reakce.

Tabulka 9 - Zastoupení extrahovaných mastných kyselin v jednotlivých frakcích

	PFA	1. vzorek		2. vzorek		3. vzorek		průměr	SD	RSD %
		plocha	% plochy	plocha	% plochy	plocha	% plochy			
1.frakce	MePFOA	283310	52,0	215154	48,0	178246	49,3	49,8	1,7	3,3
	MePFDA	395536	61,2	326189	56,0	234424	57,0	58,1	2,3	3,9
	MePFDoA	131752	69,2	93197	62,0	71711	65,0	65,4	3,0	4,5
2.frakce	MePFOA	145683	26,7	110884	25,0	93557	26,0	25,9	0,7	2,7
	MePFDA	160172	24,8	141429	24,0	102651	25,0	24,6	0,4	1,8
	MePFDoA	42077	22,1	34010	23,0	25013	23,0	22,7	0,4	1,9
3.frakce	MePFOA	65644	12,0	63027	15,0	48471	13,0	13,3	1,2	9,4
	MePFDA	56241	8,7	66141	11,0	42616	10,5	10,1	1,0	9,8
	MePFDoA	11310	5,9	13172	9,0	8526	8,0	7,6	1,3	16,9
4.frakce	MePFOA	33229	6,1	38003	8,5	27773	7,6	7,4	1,0	13,4
	MePFDA	23248	3,6	34748	6,0	21076	5,1	4,9	1,0	20,2
	MePFDoA	3566	1,9	6274	4,2	3354	3,0	3,0	0,9	31,0
5.frakce	MePFOA	17156	3,1	18519	4,2	13279	3,7	3,7	0,4	12,3
	MePFDA	10503	1,6	13269	2,3	8760	2,1	2,0	0,3	14,7
	MePFDoA	1681	0,9	3580	2,4	1270	1,2	1,5	0,6	43,2
suma ploch	MePFOA	545022	100	445587	100	361326	100	-	-	-
	MePFDA	645700	100	581776	100	409527	100	-	-	-
	MePFDoA	190386	100	150233	100	109874	100	-	-	-

Tabulka 10 - Zastoupení extrahovaných perfluorovaných organických kyselin v jednotlivých frakcích

	FA	1. vzorek		2. vzorek		3. vzorek		průměr	SD	RSD %
		plocha	% plochy	plocha	% plochy	plocha	% plochy			
1.frakce	MeOA	268659	45,3	166125	48,3	402841	48,3	47,3	1,4	3,0
	MeDA	1643529	58,7	1244613	59,1	3026525	60,9	59,6	1,0	1,6
	MeDoA	377563	53,2	250320	56,5	622054	57,5	55,8	1,9	3,3
	MeTetraA	406822	59,4	274176	62,4	685165	62,9	61,5	1,5	2,5
2.frakce	MeOA	148485	25,0	84890	24,7	179699	21,5	23,7	1,6	6,6
	MeDA	709100	25,3	518215	24,6	1188952	23,9	24,6	0,6	2,3
	MeDoA	171267	24,1	106446	24,0	240030	22,2	23,5	0,9	3,8
	MeTetraA	156338	22,8	98402	22,4	228676	21,0	22,1	0,8	3,5
3.frakce	MeOA	102368	17,2	46972	13,6	123853	14,8	15,2	1,5	9,8
	MeDA	300644	10,7	222984	10,6	479616	9,7	10,3	0,5	4,6
	MeDoA	92215	13,0	46911	10,6	120468	11,1	11,6	1,0	8,9
	MeTetraA	70830	10,3	39622	9,0	103538	9,5	9,6	0,5	5,7
4.frakce	MeOA	52973	8,9	28584	8,3	71997	8,6	8,6	0,3	3,0
	MeDA	105470	3,8	84715	4,0	192783	3,9	3,9	0,1	2,7
	MeDoA	42111	5,9	25516	5,8	65002	6,0	5,9	0,1	1,8
	MeTetraA	29982	4,4	18464	4,2	46651	4,3	4,3	0,1	1,7
5.frakce	MeOA	20979	3,5	17678	5,1	56388	6,8	5,1	1,3	25,6
	MeDA	41330	1,5	36548	1,7	78557	1,6	1,6	0,1	6,6
	MeDoA	26682	3,8	13546	3,1	33674	3,1	3,3	0,3	9,6
	MeTetraA	21152	3,1	9069	2,1	25549	2,3	2,5	0,4	17,3
suma ploch	MeOA	593464	100	344249	100	834778	100	-	-	-
	MeDA	2800073	100	2107075	100	4966433	100	-	-	-
	MeDoA	709838	100	442739	100	1081228	100	-	-	-
	MeTetraA	685124	100	439733	100	1089579	100	-	-	-

Pro kontrolu přesnosti měření byl porovnán poměr ploch perfluorovaných kyselin (PFDA, PFDoA) ku vnitřnímu standardu (MePFOA), viz. tabulka 11.

Tabulka 11 – Poměry ploch analytů MePFDA, MePFDoA ku vnitřnímu standardu MePFOA

	PFA	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	průměr	SD	RSD%
1.frakce	MePFOA	1	1	1	1,000	0	0
	MePFDA	1,40	1,52	1,32	1,409	0,083	5,9
	MePFDoA	0,47	0,43	0,40	0,434	0,026	5,9

Pro ověření účinnosti extrakce byly provedeny dvě derivatizace PFOA. V první reakční směsi byla jako vzorek pouze PFOA o koncentraci 1000 µg/ml a ve druhé byl ke vzorku PFOA přidán jako standardní přídavek MePFOA taktéž o koncentraci 1000 µg/ml. Výpočet byl proveden dle vztahu:

$$u\% = \frac{A_v}{A_{v+s} - A_v} \times 100$$

kde A_v je plocha píku MePFOA a A_{v+s} je plocha píku MePFOA se standardním přídatkem. Po dosazení do vztahu dostáváme

$$u\% = \frac{197474}{559463 - 197474} \times 100 = 54,5 \%$$

Výsledek dobře koreluje s průměrnou hodnotou účinnosti extrakce pro PFOA z tabulky 11.

4.4 Optimalizace

4.4.1 Screening parametrů

Screening parametrů slouží k výběru takových parametrů, které nejvíce ovlivňují výslednou odezvu. V tomto případě došlo k výběru základní sady parametrů pro screening na základě předchozí práce s podobnou tematikou, která se taktéž zabývala derivatizací perfluorovaných kyselin [30]. V tabulce x je zobrazen způsob kódování parametrů na dvou hladinách pro jejich využití v Plackett-Burmanově screeningové matici.

Tabulka 12 - Kódované parametry pro screening design

	min. hodnota	max. hodnota
Parametr	-1	1
doba reakce (min)	1	15
teplota (°C)	25	60
doba ultrazvuku (min)	0	2
objem pyridinu (μL)	1	10
objem MCF (μL)	5	100
doba třepání (min)	1	10
dummy1	-1	1

Výsledky screeningu efektů prvního řádu, kde se predikuje vliv parametrů na odpověď měřicího procesu bez zkoumání vlivu vzájemné interakce mezi jednotlivými parametry zobrazuje tabulka 12. Výpočty významnosti efektů byly provedeny v programu NCSS metodou ANOVA.

Screeningem parametrů metodou dle Plackett-Burmana a provedením příslušných výpočtů bylo zjištěno, že největší vliv na odpověď měřicího procesu má objem pyridinu, který byl vyhodnocen jako významný parametr u všech kyselin ve směsi i pro jednotlivé soubory analytů (PFA+FA, PFA-FA, PFA, FA). Doba vytřepávání derivatizační směsi do heptanu byla taktéž určena jako významná, ovlivňovala mimo jiné všechny kyseliny ve směsi a dva soubory analytů (PFA-FA, PFA). Srovnání

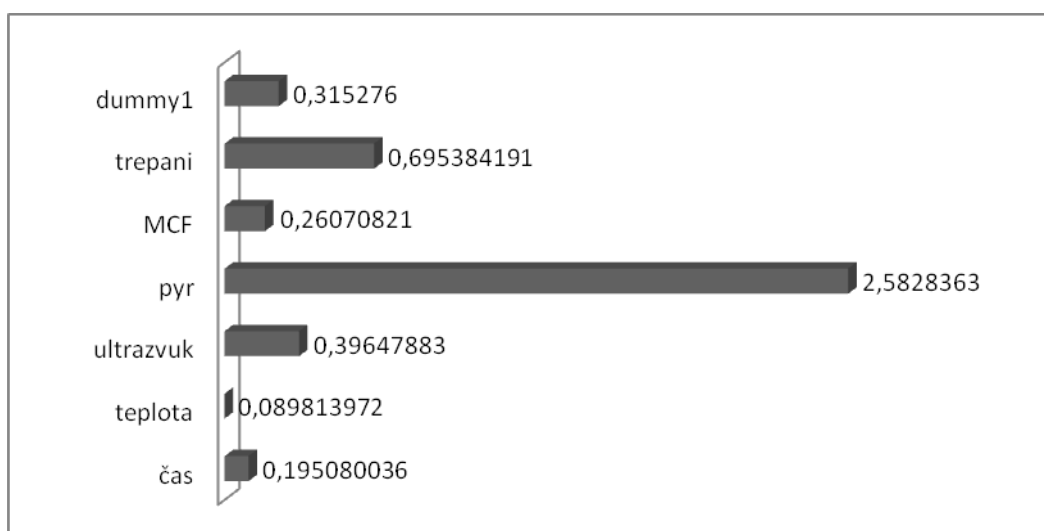
výsledků screeningu mezi FA a PFA+FA ukazuje na převažující vliv FA v uvedeném součtu odezev. Z tabulky 13 je patrné, že rozdíl odezev perfluorovaných a mastných kyselin (PFA-FA) je významně ovlivňován i objemem MCF. Z tohoto důvodu byl parametr objem MCF zařazen do souboru parametrů pro následnou optimalizaci metodou CCD.

Tabulka 13 – Výsledky screeningu vyhodnocené programem NCSS

absolutní plochy	čas	teplota	ultrazvuk	pyr	MCF	třepání	dummy
MeOA				*			
MeDoA				*		*	
MeTetA				*	*	*	
MePFOA				*		*	
MePFDA				*		*	
MePFDoA				*		*	
FA				*			
PFA				*		*	
PFA + FA				*			
PFA – FA	*	*		*	*	*	

významný efekt označen *

Pro ověření výsledků screeningu z programu NCSS byl proveden výpočet významnosti efektů dle [56]. Tímto výpočtem byl jako významný pro PFA+FA určen parametr třepání, proto došlo k jeho zařazení mezi parametry pro CCD.



Obrázek 5 - Pareto graf významnosti parametrů pro směs perfluorovaných a mastných kyselin - hlavní efekty z Plackett-Burmanova designu překračují vypočtenou hranici 0,467

4.4.2 Central composite design

Tyto parametry byly podrobeny dalšímu testování na pěti úrovních jejich hodnot, přičemž centrálními body byly zvoleny hodnoty používané v dosud prováděných derivatizacích. Hodnoty parametrů a jejich kódování shrnuje tabulka 14. Ostatní parametry v derivatizacích zůstaly zachovány na původních hodnotách.

Tabulka 14 – Skutečné hodnoty parametrů pro central composite design

Parametr	$-\alpha$	-1	0	1	α
objem pyridinu	0,5	2	4	6	7,5
objem MCF	1,5	5	10	15	19
doba třepání	1,5	3	5	7	9

Bylo provedeno dvacet měření navržených programem Statease pro nalezení optima metodou central composite design. Vyhodnocením výsledků měření metodou Analysis of Variance (ANOVA) v tomtéž programu byly získány hodnoty koeficientů polynomiální rovnice pro jednotlivé skupiny analytů (tabulka 15).

Polynomiální rovnice byla ve tvaru:

$$\text{Odezva} = \beta + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3 + c_1x_1^2 + c_2x_2^2 + c_3x_3^2$$

Kde koeficienty a_i jsou pro příspěvky prvního řádu, koeficienty c_i pro parametry druhého řádu a koeficienty b_{ij} pro interakce parametrů a β je residuální odezva, kterou nelze modelem objasnit. Tato rovnice popisující náš model odezvy na zvolené parametry byla vybrána v kvadratické formě, aby v modelu byly zahrnuty jak vzájemné interakce parametrů, tak i možné zakřivení odezvosvé plochy modelu.

Dále byl u každé rovnice určen koeficient determinace R^2 , který ukazuje míru shody mezi modelem a naměřenými daty.

Tabulka 15 – Hodnoty koeficientů polynomiální rovnice pro jednotlivá optima a koeficientu determinace

	PFA+FA	PFA - FA	FA	PFA
β	+2.54412	+1.26101	+0.64155	+1.90256
x_1 (pyr)	+0.63125	-0.45459	+0.54292	+0.088329
x_2 (MCF)	-0.15488	+0.89655	-0.52571	+0.37084
x_3 (třepání)	+0.12302	-0.036006	+0.079515	+0.043509
x_1	-0.18061	+0.76979	-0.47520	+0.29459
$x_2(\text{pyr}*\text{MCF})$				
$x_1 x_3$	+3.84944	-0.14687	+0.075358	-0.071509
(pyr*třepání)				
$x_2 x_3$	-0.039655	+0.073926	-0.056790	+0.017135
(MCF*třepání)				
$x_1^2(\text{pyr}^2)$	+0.19934	-0.19221	+0.19578	+3.56415
$x_2^2(\text{MCF}^2)$	+0.16298	-0.56977	+0.36637	-0.20340
$x_3^2(\text{třepání}^2)$	+0.013037	-0.15307	+0.083052	-0.070015
R^2	0.8785	0.8875	0.9589	0.6954

V programu Statease byla provedena optimalizace parametrů funkcí desirability. Výsledné optimalizované hodnoty pro jednotlivá uspořádání shrnuje tabulka 16.

Tabulka 16 – Kódované a skutečné hodnoty požadovaných optim

	Kódované hodnoty			Skutečné hodnoty		
	objem pyridinu (μl)	objem MCF (μl)	doba třepání (min)	objem pyridinu (μl)	objem MCF (μl)	doba třepání (min)
PFA+FA	1,28	-1,26	0,38	6,7	3,7	5,75
PFA-FA	1,68	1,48	-1,42	7,5	17,5	2,15
PFA	0,93	1,33	-0,56	5,9	16,6	3,86
FA	1,52	-1,17	1,38	7,0	4,1	7,75

K jednotlivým optimalizovaným hodnotám byly vytvořeny příslušné komentované 3D nebo vrstevnicové grafy odezvvé plochy.

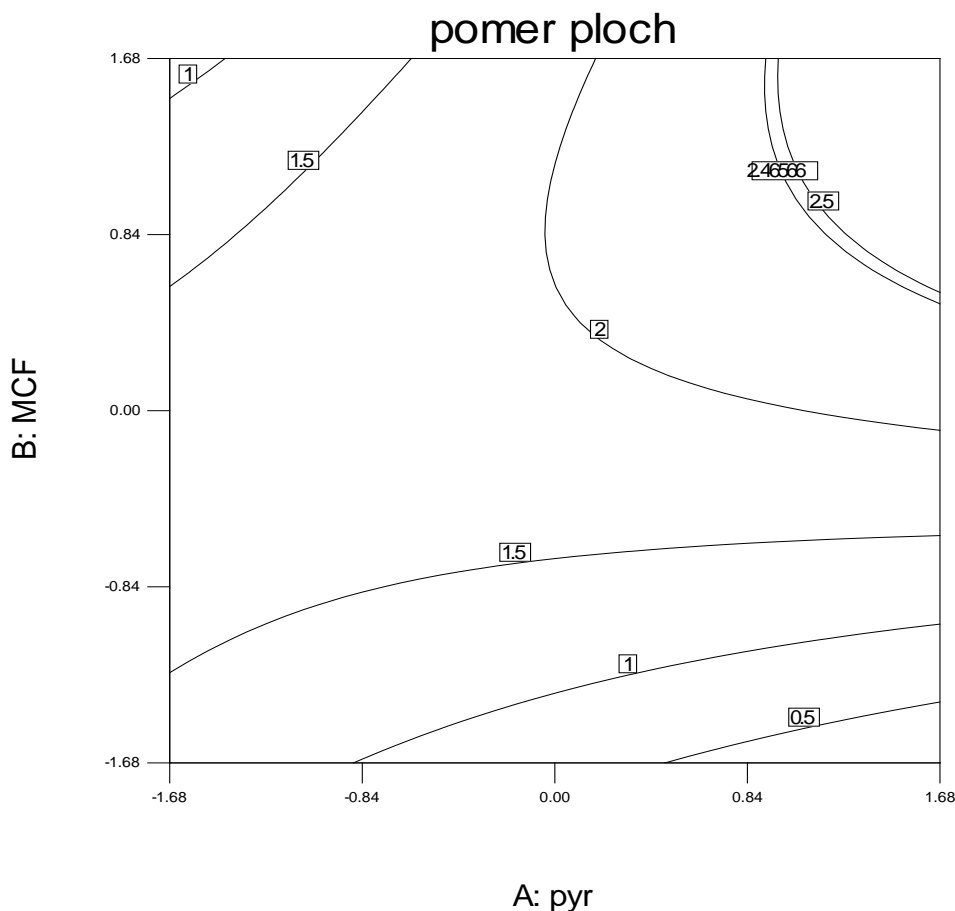
4.4.3 Optimalizace PFA

Derivatizační podmínky používané v průběhu práce byly převzaty z práce [30]. Tyto podmínky byly optimalizované metodou one variable at time (OVAT), kdy po optimalizaci došlo k 60% nárůstu ploch píků analytů. Byla provedena derivatizace standardní směsi dle převzatých podmínek (PFOA, PFDA, PFDoA, OA, DoA, TetraA a MeDA jako vnitřní standard), naměřené plochy píků analytů byly dány do poměru k ploše píku vnitřního standardu. Dále byla provedena derivatizace standardní směsi dle optimalizovaných podmínek derivatizace pro PFA, následovaná taktéž přepočtem ploch píků analytů k IS. Porovnáním celkových ploch píků perfluorovaných kyselin z obou analýz vyplynulo, že optimalizované derivatizační podmínky vedou ke 103% nárůstu celkových ploch dle tabulky 17.

Tabulka 17 – Hodnoty odezev z optimalizovaných analýz

	PFA	PFA-FA	PFA+FA	FA	derivatizace dle [29] (PFA)
experimentální odezva	2,53	-0,2	4,24	4,01	1,25
predikovaná odezva	2,46	1,88	4,48	4,39	x

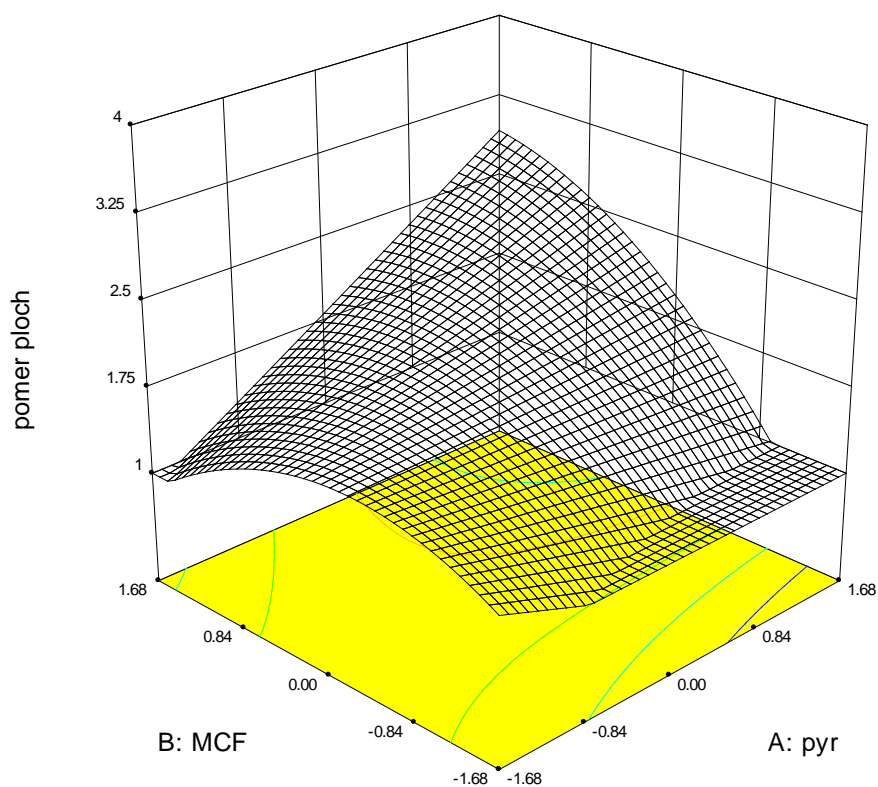
Predikovaný součet poměrů ploch PFA pro tuto optimalizaci programem Statease byl 2,46 a naměřený 2,53, rozdíl mezi hodnotami je pouze tříprocentní.



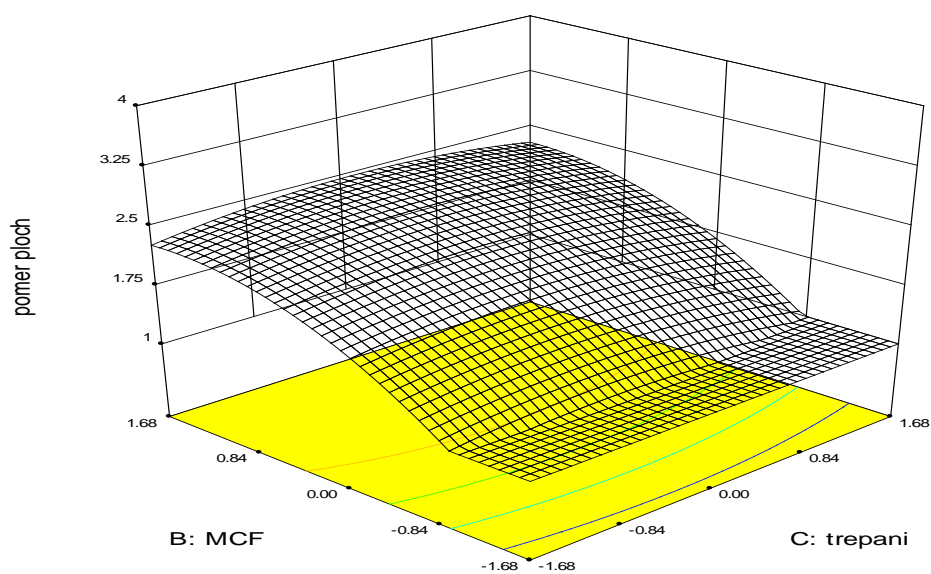
Obrázek 6 – Vrstevnicový graf znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu pyridinu (A) a MCF (B), přičemž parametr třepání je nastaven na optimální hodnotu -0,56 (3,86min). Maximální dosažitelná hodnota odezvy 2,46 je vyznačena vrstevnicí. Rostoucí odezva je vyznačena barevně v pořadí od modré přes zelenou a žlutou k červené

Z obrázku 6 je patrné, že optimalizace metodou OVAT, kdy je konstantní koncentrace pyridinu a mění se koncentrace MCF a naopak, je pro vyhledání optima nedostatečná. Pokud zvolíme za konstantní hodnotu koncentraci pyridinu v bodě 0, změnou koncentrace MCF se můžeme dostat přinejlepším na hodnotu poměrů ploch 1,9 a v případě konstantní hodnoty koncentrace MCF a změnách koncentrace pyridinu na hodnotu 2. V tomto případě by se musela koncentrace obou látek zvyšovat společně pro docílení maximálního poměru ploch, což je i praktickým důkazem výhody CCD oproti

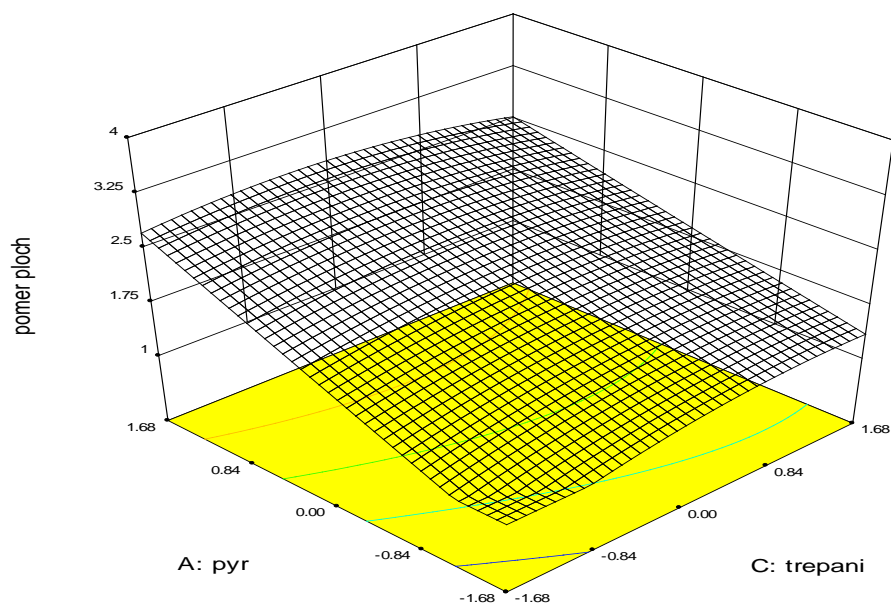
OVAT, kterou nelze zjistit vzájemné interakce mezi parametry. Následující 3D grafy ukazují vzájemnou závislost jednotlivých parametrů a příslušné odezвовé plochy.



Obrázek 7 – Odezвовá plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu pyridinu (A) a MCF (B), přičemž parametr doba třepání nastaven na optimální hodnotu - 0,56 (3,86min)



Obrázek 8 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu MCF (B) a dobou třepání (C), přičemž parametr objem pyridinu je nastaven na optimální hodnotu 0,93 (5,9 μ l)



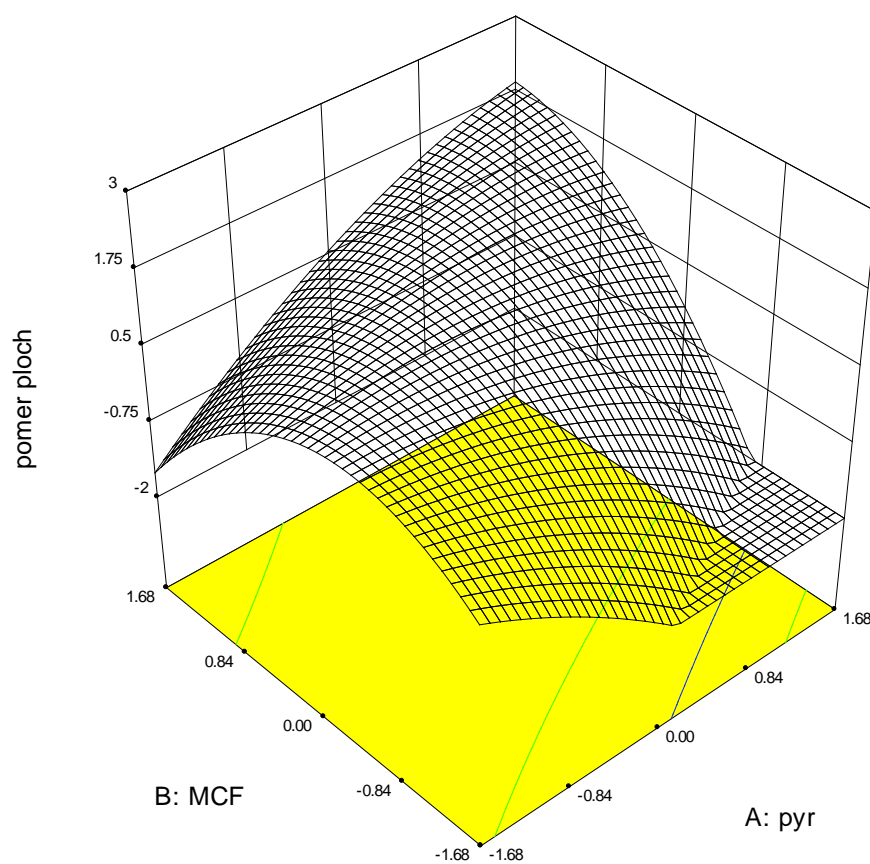
Obrázek 9 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu pyridinu (A) a dobou třepání (C), přičemž parametr objem MCF je nastaven na optimální hodnotu 1,33 (16,6 μ l)

Z obrázků 8, 9 lze vyvodit, že doba třepání má ze tří vybraných parametrů s největšími efekty nejmenší vliv na celkovou odezvu. Parametr objem MCF má

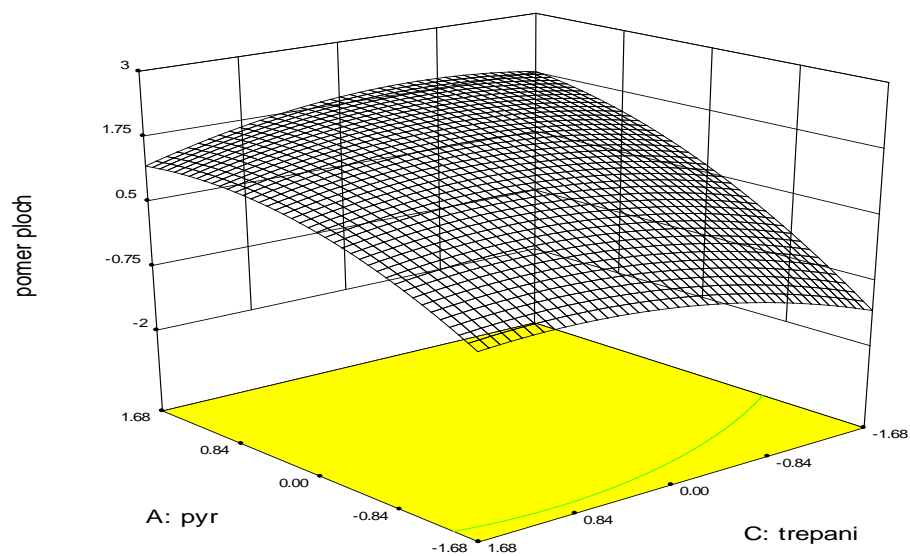
vzhledem k nárůstu na hodnotu 16,6 μ l oproti standardnímu derivatizačnímu objemu 10 μ l signifikantní vliv na selektivitu derivatizace PFA.

4.4.4 Optimalizace PFA-FA

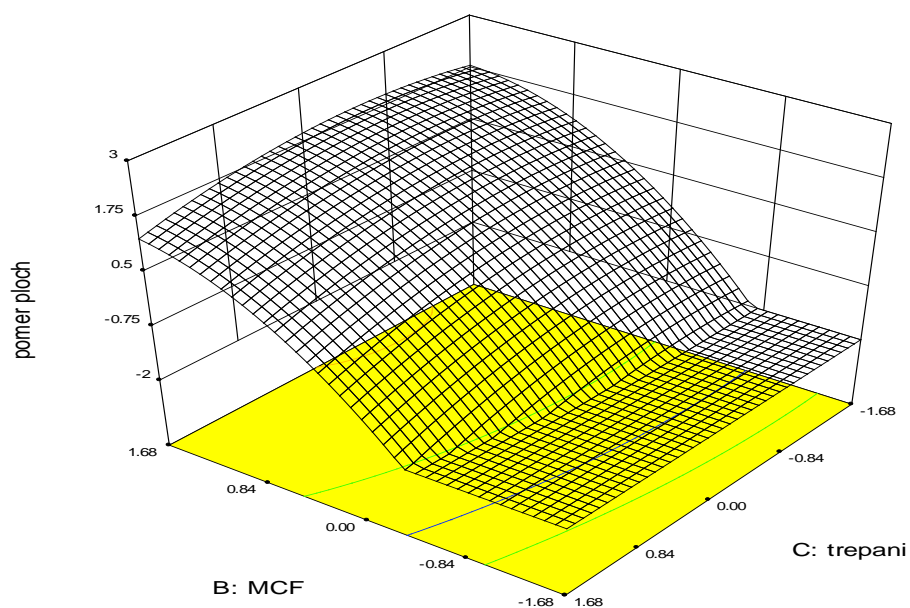
Vzhledem k tomu, že v práci bylo jako vzorku užíváno směsi PFA a FA, bylo dalším cílem nalézt takové podmínky derivatizace, pro které by byly perfluorované kyseliny selektivně derivatizovány např. pro použití při analýze biologických vzorků tkání. Směs PFA-FA byla derivatizována dle optima uvedeného v tabulce 16. Výsledné plochy píků byly dány do poměru k IS a od celkové plochy perfluorovaných kyselin byla odečtena celková plocha mastných kyselin, představující odezvu. Rozdíl činil -0,2, přičemž predikovaný rozdíl odezev PFA-FA pro tuto optimalizaci programem Statease byl 1,88. V tomto případě je výsledek měření daleko od optimální hodnoty, ačkoli cíl v podobě většího celkového poměru ploch píků PFA ku FA splněn byl. Pro rozdíl poměrů ploch PFA-FA byl ve screeningu faktorů překvapivě určen jako důležitý parametr též čas a teplota (tabulka 13). Na jednotlivé mastné ani perfluorované kyseliny neměly tyto dva faktory vliv. Je proto možné se domnívat, že FA a PFA se během derivatizace vzájemně ovlivňují. Na obrázku 10 je možno vidět odezvou plochu parametrů objem MCF a pyridinu, z kterého je patrné, že maximum má tendenci růst po „hřebeni“, což indikuje potřebu změny intervalů experimentálních parametrů pro dosažení hodnotnějšího optima. Z obrázků 11 a 12 plyne, že třepání má v tomto případě nejmenší vliv na velikost odezev. Taktéž je vidět, že při nastavené optimální hodnotě objemu MCF na obrázku 11 je i při poklesu objemu pyridinu a jakékoli změně doby třepání dosaženo alespoň částečné derivatizace PFA. Naopak z obrázku 12, kde je zobrazen průběh odezvous plochy při nastavené optimální hodnotě objemu pyridinu, je vidět, že při poklesu objemu MCF pod centrální bod (bod 0 na ose B) dochází k fatálnímu poklesu hodnot odezev. S poklesem objemu MCF tedy dochází k pravděpodobné přednostní derivatizaci mastných kyselin.



Obrázek 10 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu pyridinu (A) a MCF (B), přičemž parametr doba třepání nastaven na optimální hodnotu -1,42 (2,15min)



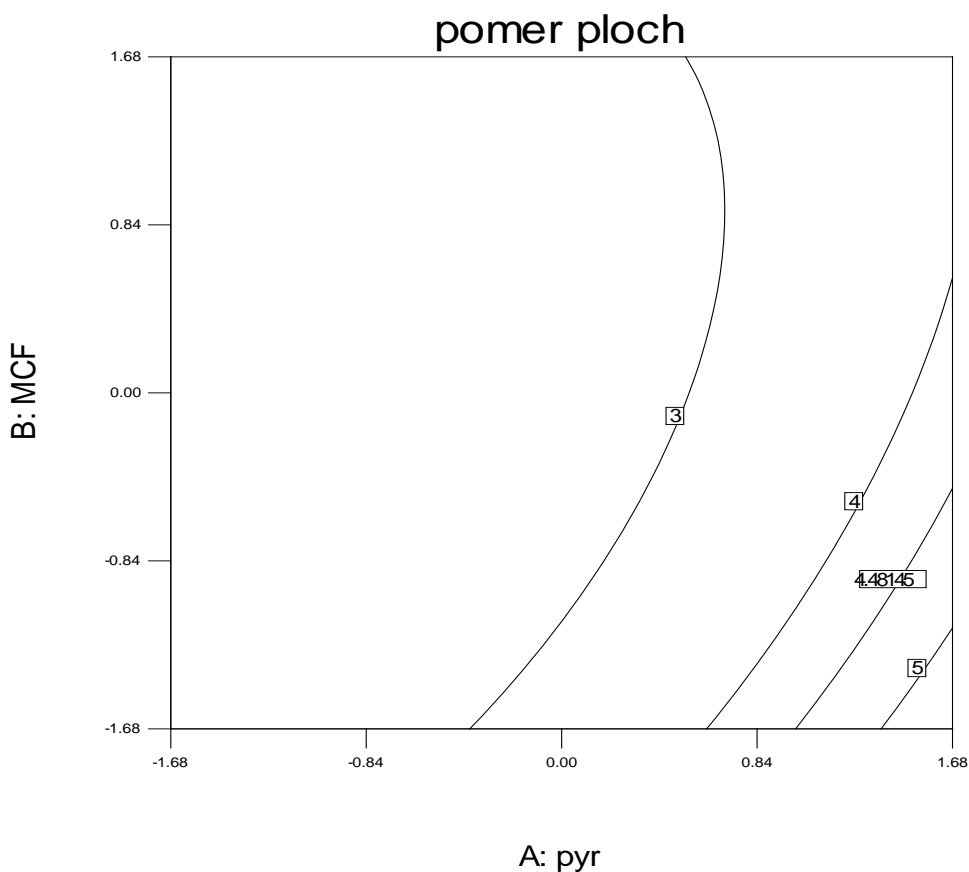
Obrázek 11 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu pyridinu (A) a dobou třepání (C), přičemž parametr objem MCF je nastaven na optimální hodnotu 1,48 (17,5 μ l)



Obrázek 12 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu MCF (B) a dobou třepání (C), přičemž parametr objem pyridinu je nastaven na optimální hodnotu 1,68 (7,5 μ l)

4.4.5 Optimalizace PFA+FA

Z důvodu porozumění vztahům mezi jednotlivými vybranými parametry s největším vlivem na výsledek měření bylo cílem nalézt optimum i pro dosažení největších ploch píků jak mastných tak perfluorovaných kyselin. Byla provedena derivatizace směsi PFA+FA dle optimálních podmínek z tabulky 16. Plochy píků jednotlivých kyselin byly opět dány do poměru k vnitřnímu standardu. Predikovaný součet poměrů ploch píků programem Statease byl pro toto experimentální uspořádání 4,48. Součet poměrů ploch píků všech kyselin k IS v rámci ověřovací derivatizace za optimálních podmínek činil 4,24, shoda s modelem tedy dosáhla výborné hodnoty 94,6%.

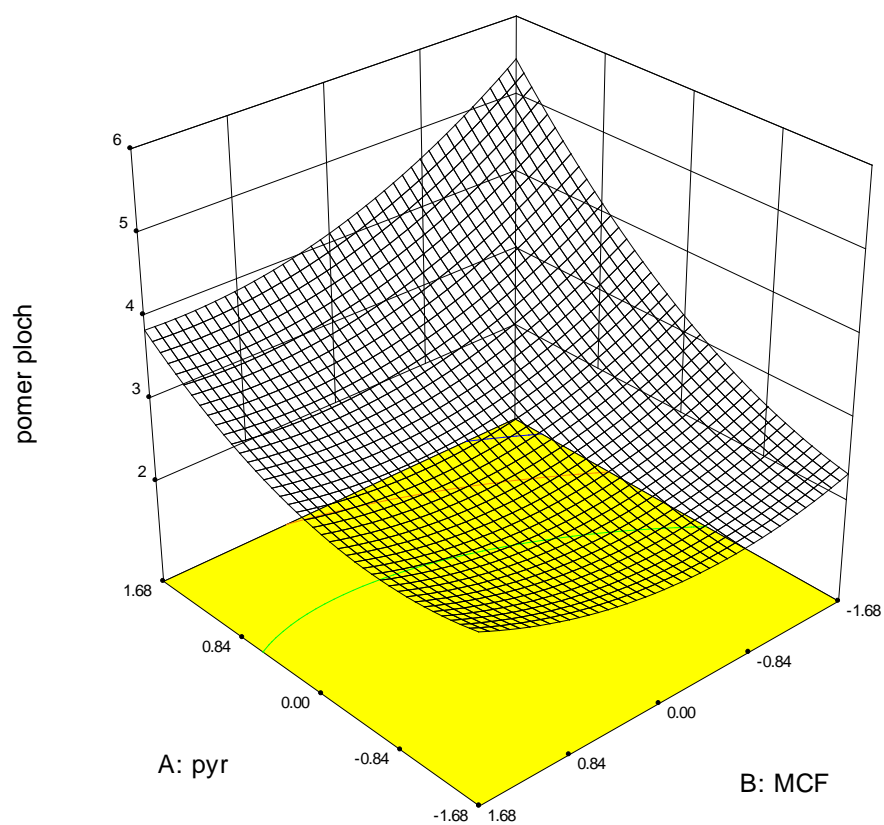


Obrázek 13 – Vrstevnicový graf znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu pyridinu (A) a MCF (B), přičemž parametr doba třepání nastaven na optimální hodnotu 0,38 (5,75min), optimální hodnota poměrů ploch pro 4,48

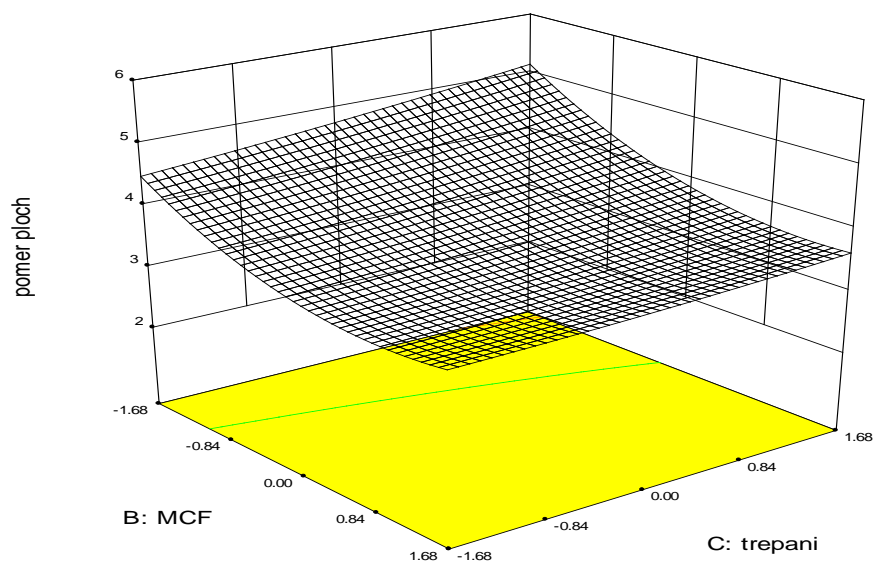
Z obrázků 13 a 14, kde je parametr doba třepání nastaven na optimální hodnotu, plyne, že optimum je v nastavených intervalech parametrů objem pyridinu a objem MCF dosahováno ve velmi malé části zkoumané odezvové plochy. V předchozích oddílech bylo zjištěno, že objem MCF má vliv především na derivatizaci PFA, a že součet odezev pro jednotlivé FA nabývá větších hodnot než součet odezev pro jednotlivé PFA. Proto je i na obrázku 13 patrné, že vliv na maximální odezvu součtu ploch píků mastných a perfluorovaných kyselin má především parametr objem pyridinu, který při nízkém objemu MCF způsobuje hladkou derivatizaci FA. Z celkové odezvy po provedení derivatizace dle optima v tabulce 16 tvoří PFA pouze pětinu, což dostatečně odůvodňuje vhodnější podmínky pro optimalizaci FA v optimu pro součet odezev PFA+FA.

Z obrázku 15 lze potvrdit výše uvedené závěry. S klesajícím objemem MCF při optimálně nastaveném objemu pyridinu je dosahováno optimálních hodnot při jakékoli hodnotě parametru doba třepání. Naopak nárůst objemu MCF při jakékoli hodnotě doby třepání vede k pouze minimálnímu poklesu velikosti odezvové plochy. Pyridin je tedy klíčovým parametrem pro maximalizaci odezvy součtu ploch píků obou skupin analytů.

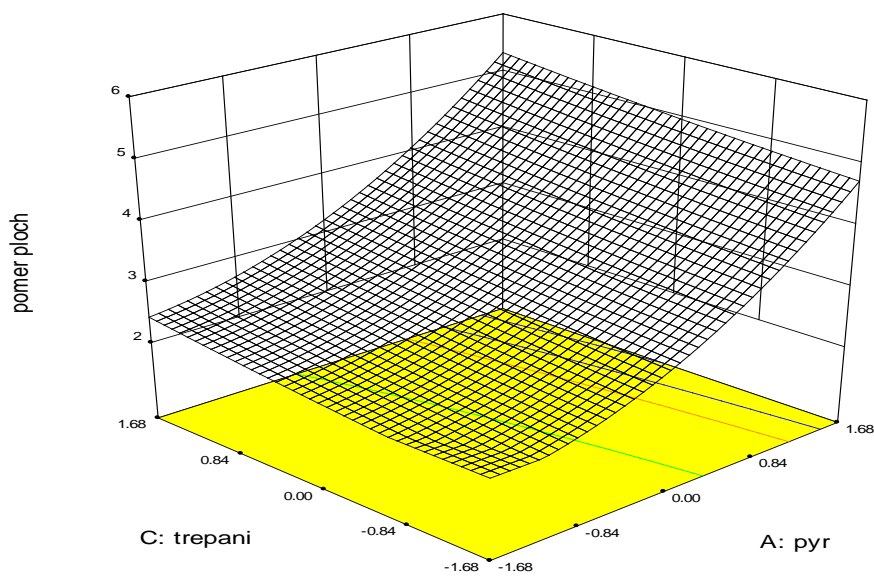
Odezvová plocha na obrázku 16 zobrazuje vliv parametrů objem pyridinu a doba třepání, kde je parametr objem MCF nastaven na optimální hodnotu. Změna doby třepání opět vede k pouze nepatrně větší odezvě při zvyšování její hodnoty, zatímco pokles objemu pyridinu k dolní hranici experimentálního intervalu jeho hodnot zapříčiňuje dosažení minima pro tento interval při jakékoli hodnotě parametru doba třepání.



Obrázek 14 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objem pyridinu (A) a MCF (B), přičemž parametr doba třepání nastaven na optimální hodnotu 0,38 (5,75min)



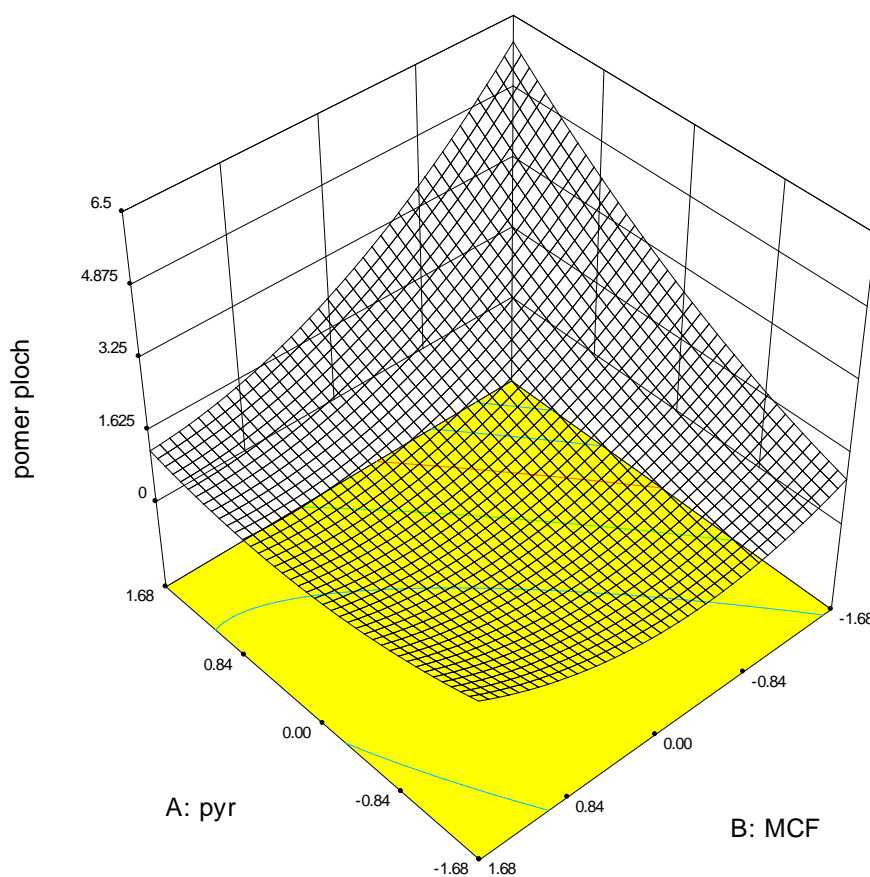
Obrázek 15 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objem MCF (B) a dobou třepání (C), přičemž parametr objem pyridinu je nastaven na optimální hodnotu 1,28 (6,7 μ l)



Obrázek 16 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objem pyridinu (A) a dobou třepání (C), přičemž parametr objem MCF je nastaven na optimální hodnotu -1,26 (3,7 μ l)

4.4.6 Optimalizace FA

Poslední optimalizace byla provedena již jen pro ověření možné výše vyslovených závěrů o derivatizaci mastných kyselin ve směsi s perfluorovanými. Byla provedena derivatizace směsi PFA a FA dle optimálních podmínek pro FA dle tabulky 16. Plochy píků jednotlivých kyselin byly opět dány do poměru k vnitřnímu standardu. Predikovaný součet poměrů ploch píků – odezva byl programem Statease pro toto experimentální uspořádání 4,39 dle tabulky 17. Součet poměrů ploch píků mastných kyselin k IS v rámci ověřovací derivatizace za optimálních podmínek činil 3,37, shoda s modelem tedy dosáhla hodnoty 76,8%. Navzdory nižší shodě s modelem však došlo k poklesu sumy poměrů ploch píků perfluorovaných kyselin na nejnižší hodnotu ze všech optimalizací a proto bylo docíleno částečné selektivity derivatizace.

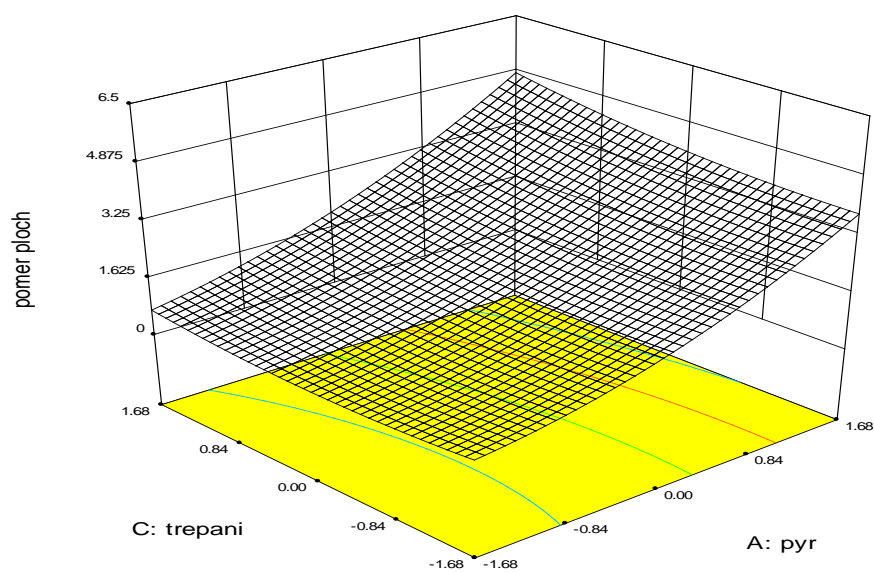


Obrázek 17 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objem pyridinu (A) a MCF (B), přičemž parametr doba třepání nastaven na optimální hodnotu 1,38 (7,75min)

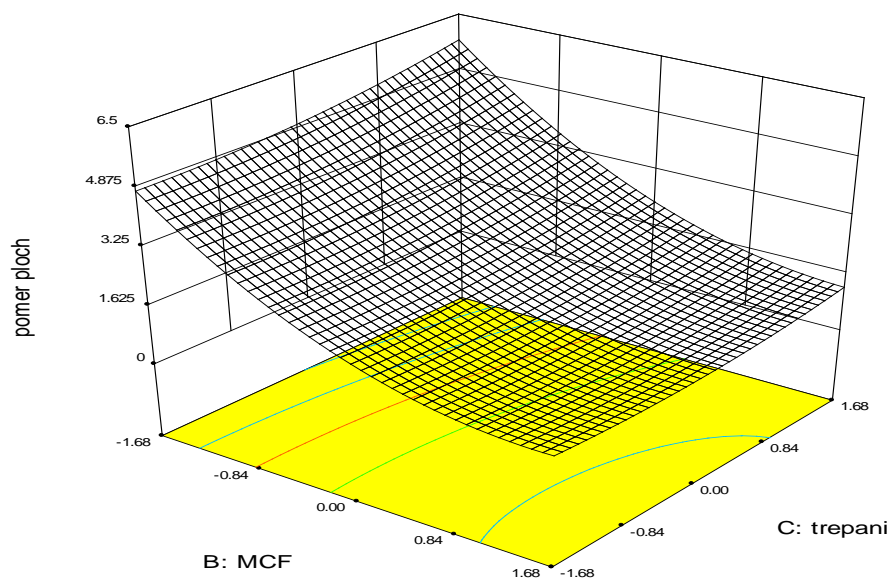
Ze závěrů uvedených v kapitole 4.4.5 můžeme očekávat podobný průběh odezvové plochy pro dvojice parametrů v jednotlivých grafech i pro optimum FA. Odezvová plocha na obrázku 17 zobrazuje vliv parametrů objem pyridinu a MCF, kde parametr doba třepání je nastaven na optimální hodnotu. V porovnání s obrázkem 14 je patrné, že pokud plochy píků PFA nejsou součástí odezvové plochy, dochází při nárůstu objemu MCF k poklesu hodnoty odezvové plochy i v oblasti maximálního objemu pyridinu. Na obrázku 14, kde je součástí odezvové plochy i součet ploch perfluorovaných kyselin dochází ve stejné oblasti grafu jen k mírnému poklesu odezvy, protože za těchto podmínek dochází k nárůstu ploch píků perfluorovaných kyselin.

Na obrázku 18 je zobrazena odezvová plocha pro parametry objem pyridinu a doba třepání, kde parametr objem MCF je nastaven na optimální hodnotu. Opět je vidět, že objem pyridinu má na odezvu pro FA zásadní vliv, zatímco doba třepání způsobuje nepatrné zvětšení oblasti optima s jejím nárůstem.

Odezvová plocha na obrázku 19 zobrazuje vliv parametrů objem MCF a doba třepání, kde parametr objem pyridinu je nastaven na optimální hodnotu. S klesajícím objemem MCF dochází k markantnímu nárůstu odezvové plochy a jde opět o potvrzení předpokladu, že objem MCF ovlivňuje selektivitu derivatizace FA a PFA. Parametr doba třepání opět nepatrně zvyšuje maximum odezvy v oblasti nejnižšího objemu MCF.



Obrázek 18 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu pyridinu (A) a dobou třepání (C), přičemž parametr objem MCF je nastaven na optimální hodnotu -1,17 (4,1 μ l).



Obrázek 19 – Odezvová plocha znázorňující vztah mezi kódovanými hodnotami objemu MCF (B) a dobou třepání (C), přičemž parametr objem pyridinu je nastaven na optimální hodnotu 1,52 (7,0 μ l)

5. Shrnutí a závěr

Byly provedeny kalibrace pro všechny studované kyseliny. Jako nejcitlivější se ukázala metoda GC-EI-MS pro PFDA se směrnici (0,013123 ml/ μ g) a nejméně citlivou pro OA se směrnici (0,002364 ml/ μ g).

Pro všechny kyseliny byly určena účinnost extrakce z ACN do heptanu, která je posledním krokem u použité derivatizačního postupu. Hodnoty účinnosti extrakce leží přibližně v rozsahu 50 – 65%.

Bylo zjištěno, že pro řadu PFA $C_8 - C_{10} - C_{12}$ s rostoucím počtem atomů uhlíků v řetězci roste extrakční účinnost přibližně o 7%. Podobný trend, i když ne tak výrazný, byl nalezen i u mastných kyselin. Navíc byla extrakční účinnost potvrzena metodou standardního přídatku pro PFOA.

Pro optimalizaci derivatizačního procesu byl metodou Plackett-Burman proveden screening experimentálních parametrů. Z původní sady šesti parametrů byly vybrány dva pro téměř všechny kyseliny (objem přidaného pyridinu a doba třepání), zatímco další parametry (objem přidaného MCF, reakční doba a teplota) se lišily podle druhu kyseliny.

Vybrané experimentální parametry byly podrobeny optimalizaci metodou CCD zahrnující oproti screening i efekty druhého řádu a interakce mezi jednotlivými parametry. Žádný z výpočtů nenalezl „skutečné“ optimum ve formě vrcholu odezvové plochy, ale pouze jako krajní hodnoty použitých intervalů experimentálních parametrů. Byla nalezena optima podmínek derivatizace pro odezvy jednak FA, PFA, tak i pro součet odezev (PFA+FA) a rozdíl odezev (PFA-FA). U PFA byla shoda s modelem nejmenší (malý koeficient determinace), navzdory téměř stoprocentní shodě s predikovanou hodnotou odezvy. U rozdílu odezev (PFA-FA) je situace přesně opačná. Toto může být způsobeno tím, že do optimalizace nebyly zahrnuty všechny experimentální parametry zjištěné ve screeningu jako významné. U součtu odezev (PFA+FA) byla dosažena výborná shoda modelu s experimentem. Bylo zjištěno, že FA ovlivňují celkovou odezvu více než PFA.

Ukázalo se, že v případě požadavku selektivní derivatizace PFA v přítomnosti FA je nejdůležitějším parametrem objem přidaného MCF.

Vzhledem ke stanoveným cílům práce lze konstatovat, že:

(a) použitím sofistikovaných statistických metod bylo dosaženo zvýšení účinnosti derivatizace PFA o 103% oproti výchozí metodě převzaté z [30]

(b) a (c) absolutní selektivity derivatizace pro tyto dvě skupiny analytů nebylo dosaženo, ovšem vhodnou volbou experimentálních podmínek lze do určitého stupně ovlivnit účinnost derivatizace jedné skupiny kyselin na úkor druhé.

Pro další zvýšení selektivity derivatizace PFA v přítomnosti FA bude zapotřebí rozšířit nebo změnit rozsah intervalů experimentálních parametrů.

6. Zkratky

OVAT	one variable at time
PTFE	polytetrafluorethylen
SPE	extrakce na pevné fázi
PFC	perfluorované sloučeniny
HPLC	kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
AFFF	
PFA	perfluorované organické kyseliny
FA	mastné kyseliny
GC-EI-MS	
HPLC-MS-MS	
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
GC-NCI-MS	
IS	vnitřní standard
SP	standardní přídavek
CCD	central composite design
RSM	metoda odezvové plochy
PFHxA	perfluorhexanová kyselina
PFOA	perfluoroktanová kyselina
PFDA	perfluordekanová kyselina
PFD _o A	perfluordodekanová kyselina
MePFOA	methylester perfluoroktanové kyseliny
MePFDA	methylester perfluordekanové kyseliny
MePFD _o A	methylester perfluordodekanové kyseliny
OA	oktanová kyselina
DA	dekanová kyselina
DoA	dodekanová kyselina
TetraA	tetradekanová kyselina
MeOA	methylester oktanové kyseliny

MeDA	methylester dekanové kyseliny
MeDoA	methylester dodekanové kyseliny
MeTetraA	methylester tetradekanové kyseliny
ACN	acetonitril

7. Citace

- [1] de Voogt P.; Sáez M.
Analytical chemistry of perfluoralkylated substances
T. Anal. Chem. **25**, 326-342 (2006)
- [2] Moody C. A.; Field J. A.
Perfluorinated Surfactants and the Environmental Implications of Their Use in Fire-Fighting Foams
Environ. Sci. Technol. **34**, 3864-3870 (2000)
- [3] Tseng C. L.; Liu L. L.; Chen C. M.; Ding W. H.
Analysis of perfluorooctansulfonate and related fluorochemicals in water and biological tissue samples by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry
J. Chrom. A **1105**, 119-126 (2006)
- [4] Houde M.; Martin J. W.; Letcher R. J.; Salomon K. R.; Muir D. C. G.
Biological Monitoring of Polyfluoroalkyl Substance: A Review
Environ. Sci. Technol. **40**, 3463-3473 (2006)
- [5] Nordstierna L.; Furó I.; Stilbs P.
Mixed Adsorption of Fluorinated and Hydrogenated Surfactants
Langmuir **22**, 7969-7974 (2006)
- [6] Powley C. R.; Michalczyk M. J.; Kaiser M. A.; Buxton L. W.
Determination of perfluorooctanoic acid (PFOA) extractable from the surface of commercial cookware under simulated cooking conditions by LC/MS/MS
Analyst **130**, 1299-1302 (2005)
- [7] Weremiuk A. M.; Gerstmann S.; Frank H.
Quantitative determination of perfluorinated surfactants in water by LC-ESI-MS/MS
J. Sep. Sci. **29**, 2251-2255 (2006)
- [8] Kannan K.; Choi J. W.; Iseki N.; Senthilkumar K.; Kim D. H.; Masunaga S.; Giesy J. P.
Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea
Chemosphere **49**, 225-231 (2002)
- [9] Sinclair E.; Mayack D. T.; Roblee K.; Yamashita N.; Kannan K.
Occurrence of Perfluoroalkyl Surfactants in Water, Fish, and Birds from New York State
Arch. Environ. Contam. Toxicol. **50**, 398-410 (2006)
- [10] Kudo, N.; Kawashima, Y.
Induction of Triglyceride Accumulation in the Liver Rats by Perfluorinated Fatty Acids with Different Carbon Chain Lengths: Comparison with Induction of Peroxisomal β -Oxidation

- Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 47-51 (2003)
- [11] 3M:Fluorochemicals use, distribution and release overview, company sanitized vision, St. Paul, Minnesota, USA, 1999 (dostupné na internetu)
- [12] Jahnke A.; Ahrens L.; Ebinghaus R.; Berger U.; Barber J. L.; Temme C.
An improved method for the analysis of volatile polyfluorinated alkyl substances in environmental air samples
Anal. Bioanal. Chem., **387**, 965-975 (2007)
- [13] Houde, M.; Martin, J. W.; Letcher, R. J.; Salomon, K. R.; Muir, D. C. G.
Biological Monitoring of Polyfluoroalkyl Substance: A Review
Environ. Sci. Technol., **40**, 3463-3473 (2006)
- [14] Dinglasan, M. J. A.; Ye, Y.; Edwards, E. A.; Mabury, S. A.
Fluorotelomer Alcohol Biodegradation Yields Poly- and Perfluorinated Acids
Environ. Sci. Technol., **38**, 2857-2864 (2007)
- [15] Schröder H. F.
Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents
J. Chrom. A **1020**, 131-151 (2003)
- [16] Schultz M. M.; Higgins C. P.; Huset C. A.; Luthy R. G.; Barofsky D. F.; Field J. A.
Fluorochemical Mass Flows in a Municipal Wastewater Treatment Facility
Environ. Sci. Technol. **40**, 7350-7357 (2006)
- [17] Moody, C. A.; Field, J. A.
Perfluorinated Surfactants and the Environmental Implications of Their Use in Fire-Fighting Foams
Environ. Sci. Technol., **34**, 3864-3870 (2000)
- [18] Schultz M. M.; Barofsky D. F.; Field J. A.
Quantitative Determination of Fluorotelomer Sulfonates in Groundwater by LC-MS/MS
Environ. Sci. Technol., **38**, 1828-1835 (2004)
- [19] 3M:Sulfonated Perfluorochemicals in the Enviroment: Sources, Dispersion, Fate and Effects
3M Company, St. Paul, Minnesota, USA, (2000) (dostupné na internetu)
- [20] K. U. Goss; G. Bronner; T. Harner; M. Hertel; T. C. Schmidt
The Partition Behavior of Fluorotelomer Alcohols and Olefins
Environ. Sci. Technol. **40**, 3572-3577 (2006)
- [21] M. Kannan, J. Koistinen, K. Beckmen, T. Evans, J.F. Gorzelany, K.J. Hansen, P.D.Jones, E. Helle, M. Nyman, J.P. Giesy
Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals.
Environ. Sci. Technol., 2001, **35**(8), 1593-1598.
- [22] A. Starkov, K.B. Wallace
Structural determinants of fluorochemicals-induced mitochondrial dysfunction

- [23] Revised draft, Hazard assessment of perfluorooctanoic acid and its salts, U.S. Environmental Protection Agency, Office of pollution prevention and toxics, Risk assessment division, November 4, 2002 (dostupné na internetu)
- [24] OECD: Co-Operation On Existing Chemicals-Hazard Assessment Of Perfluorooctane Sulfonate (Pfos) And Its Salts
Joint Meeting Of The Chemicals Committee And The Working Party On Chemicals, Pesticides And Biotechnology, 2002
- [25] J. Berthiaume, K.B. Wallace
Perfluorooctanoate, perfluorooctanesulfonate, and N-ethyl perfluorooctanesulfonamido ethanol, peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis.
Toxicol. Lett., 2002, **129**, 23-32.
- [26] Hušek P.
Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents
J. Chrom. B **717**, 57-91 (1998)
- [27] Hušek P.; Šimek P.; Matucha P.
Smooth Esterification of Di- and Tricarboxylic Acids with Methyl and Ethyl Chloroformates in Gas Chromatographic Profiling of Urinary Acidic Metabolites
Chromatographia **58**, 623-630 (2003)
- [28] Maradová D.
Stanovení C7 a C8 perfluorovaných kyselin metodou plynové chromatografie
Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie (2006)
- [29] Dufková V.
Stanovení perfluorovaných polutantů metodou GC a GC-MS
Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie (2007)
- [30] Dufková V.; Čabala R.; Maradová D.; Štícha M.
A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids
J. Chrom. A, **1216** (2009) 8659–8664
- [31] Vincenti M.; Ghiglione N.; Valsania M.C.; Davit P.; Richardson D.
Synthesis of Highly Fluorinated Chloroformates and Their Use as Derivatizing Agents for Hydrophilic Compounds and Drinking-Water-Disinfection By-Products
Helvetica Chimica Acta, **87**, 2004, 370-376
- [32] Hložek. T
Příprava a testování nových vysoce fluorovaných chlormravenčanů jako derivatizačních činidel pro analýzu perfluorovaných kyselin

- [33] Orata F.; Quinete N.; Wilken R.
Long Chain Perfluorinated Alkyl Acids Derivatisation and Identification in Biota and Abiota Matrices Using Gas Chromatography
Bull. Environ. Contam. Toxicol. **83**, 630–635 (2009)
- [34] Moody C. A.; Field J. A.
Determination of Perfluorocarboxylates in Groundwater Impacted by Fire-Fighting Activity
Environ. Sci. Technol. **33**, 2800-2806 (1999)
- [35] Pan L.; Pawliszyn J.
Derivatization/Solid-Phase Microextraction: New Approach to Polar Analytes
Anal. Chem. **69**, 1996-2005 (1997)
- [36] Field J. A.; Miller D. J.; Field T. M.; Hawthorne S. B.; Giger W.
Quantitative Determination of Sulfonated Aliphatic and Aromatic Surfactants in Sewage Sludge by Ion-Pair/Supercritical Fluid Extraction and Derivatization Gas Chromatography/Mass Spectrometry
Anal. Chem. **64**, 3161-3167 (1992)
- [37] Alzaga R.; Pena A.; Ortiz L.; Bayona J. M.
Determination of linear alkylbenzenesulfonates in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-mass spectrometry
J. Chrom. A **999**, 51-60 (2003)
- [38] Alzaga R.; Bayona J. M.
Determination of perfluorocarboxylic acids in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry
J. Chrom. A **1042**, 155-162 (2004)
- [39] Alzaga R.; Salgado-Pentinal C.; Jover E.; Bayona J. M.
Development of procedure for the determination of perfluorocarboxylic acids in sediments by pressurised fluid extraction, headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatographic-mass spectrometric determination
J. Chrom. A **1083**, 1-6 (2005)
- [40] Moody C. A.; Field J. A.
Determination of Perfluorocarboxylates in Groundwater Impacted by Fire-Fighting Activity
Environ. Sci. Technol., **33**, 2800-2806 (1999)
- [41] Scott, B. F.; Spencer, C.; Mabury, S. A.; Muir, D. C. G.
Poly and Perfluorinated Carboxylates in North American Precipitation
Environ. Sci. Technol., **40**, 7167-7174 (2006)
- [42] Moody, C. A.; Martin, J. W.; Kwan, W. C.; Muir, D. C. G.; Mabury, S. A.

- Determination of Perfluorinated Surfactants in Surface Water Samples by Two Independent Analytical Techniques: Liquid chromatography/ tandem mass spectrometry and ¹⁹F NMR
Anal. Chem., **73**, 2200-2206 (2001)
- [43] Johan Meyer, Veerle L.B. Jaspers, Marcel Eens, Wim de Coen
The relationship between perfluorinated chemical levels in the feathers and livers of birds from different trophic levels
Sci. Tot. Envi. **407**, 2009, 5894-5900
- [44] Zushi Y., Takeda T, Masunaga S.
Existence of nonpoint source of perfluorinated compounds and their loads in the Tsurumi River basin, Japan
Chemosphere, **71**, 2008, 1566-1573
- [45] Furdui V., Crozier P. W., Reiner E.J., Mabury S. A.
Trace level determination of perfluorinated compounds in water by direct injection
Chemosphere, **73**, 2008, S24-S30
- [46] M. Clara, O. Gans, S. Weiss, D. Sanz-Escribano, S. Scharf, C. Scheffknecht
Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: An Austrian case study
Water Research, **43**, 2009, 4760-4768
- [47] Loos R., Gawlik B. M., Locoro M., Rimaviciute E.
Serafino Contini, Giovanni Bidoglio EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters
Environmental Pollution **157**, 2009, 561-568
- [48] Frommea H., Tittlemier S. A., Volkela W., Wilhelm M., Twardella D.
Perfluorinated compounds–Exposure assessment for the general population in western countries
Int. J.Hyg.Environ.Health, **212**, (2009), 239–270
- [49] Gang L., WANG L., LIU S., LI S.
Determination of Perfluorinated Compounds in Packaging Materials and Textiles Using Pressurized Liquid Extraction with Gas Chromatography–Mass Spectrometry
Anal. Sci., March 2009, Vol. **25**
- [50] Bezerra, M.A.; Santelli, R.E.; Oliveira, E.P. ; Villar, L. S. ; Escaleira, L. A.:
Response surface methodology (RSM) as a tool for optimalization in analytical chemistry.
Talanta **76**, 965 – 977 (2008).
- [51] Leardi, R.:
Experimental design in chemistry: A tutorial.
Analytical Chimica Acta **652**, 161- 172 (2009).
- [52] Brereton, R. G.:
Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant.
Wiley.2003 str.77 s.490 Anglie
- [53] Stalikas, C.; Fiamegos, Y.; Sakkas, V.; Albanis, T.:
Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction.

J. Chrom. A **1216**, 175 – 189 (2009)

- [54] Mason, R.L. ; Gunst, R.F. ; Hess, J.L.:
Statistical design and analysis of experiment.
John Wiley 2003, 723 s.
- [55] Bourguignon, B.; Massart, D. L.:
Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function.
J. Chrom. A **586**, 11- 20 (1991)
- [56] Zichová, J.:
Plánování experimentů a predikční vícerozměrná analýza,
Praha 2007, *Karolinum*, 132 s.